

438882

P.- 60.691

HOE 74/B 011

30 JUL. 1975

MEMORIA DESCRIPTIVA

CONCEDIDA
29 SET. 1976

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

A nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

Int. Cl. 207G // 025B

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE CONJUGADOS
DE PROTEINAS"

La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de proteínas, o de mezclas de proteínas, combinadas covalentemente con compuestos orgánicos, que se denominan conjugados de proteínas. Puesto que el conjugado de proteínas a obtener se diferencia de los productos de conjugación no deseados y de los compuestos orgánicos utilizados para la conjugación en sus propiedades electroforéticas, el procedimiento para la obtención de los preparados deseados se basa en que la mezcla existente, después de realizada la reacción de conjugación, es sometida a un procedimiento de electroforesis preparativa, y la zona, que contiene los preparados deseados, es separada de las que contienen los conjugados de proteínas no deseados y los compuestos orgánicos libres.

La invención se refiere en especial a un procedimiento para la purificación de conjugados de proteína y colorante, de preferencia de sueros inmunes o de fracciones de proteínas que contienen anticuerpos después de realizada la reacción de conjugación con colorantes, en especial con colorantes de fluorescencia, por ejemplo con fluoresceín-isotiocianato, por medio de un procedimiento de electroforesis preparativa.

La invención se refiere además a conjugados de proteínas purificados por el procedimiento descrito, y a su utilización para el diagnóstico inmunológico.

El procedimiento según la invención hace posible, por las propiedades electroforéticas de los materiales de partida y de los productos de la reacción, la separación del conjugado de proteínas puro, con un de
5 terminado grado de transformación, de la proteína no reaccionada y de la molécula orgánica utilizada para la conjugación, con la condición previa de que estos tres componentes tengan una movilidad electroforética diferente.

Los conjugados de proteína y colorante, en especial los sueros inmunes que contienen anticuerpos conjugados con colorantes de fluorescencia, tienen su im
10 portancia especial, como se muestra más adelante, en la llamada técnica de inmunofluorescencia.

Sin que de ello se pueda deducir ninguna li-
15 mitación, la esencia del procedimiento según la invención será puesta de manifiesto con ayuda de estos ejemplos representativos.

La técnica de la inmunofluorescencia, introducida por A.H.Coons en 1942, permite la investigación
20 combinada de la especificidad serológica-inmunológica y de las características morfológicas del material a analizar. El fundamento de este método es la llamada reacción antígeno-anticuerpo, en la que .. uno de los dos participantes inmunológicos - por regla general el anticuerpo -
25 es conjugado con un colorante fluorescente. La puesta en

evidencia del compuesto de reacción antígeno-anticuerpo en el preparado microscópico se realiza por excitación de la fluorescencia visible mediante irradiación en la región ultravioleta.

5 La inmunofluorescencia ha encontrado una gran atención en el diagnóstico, para la identificación de antígenos y anticuerpos, tanto combinados como libres.

 Según la situación actual de la técnica, fracciones ricas en anticuerpos, en forma de los llama-
10 dos sueros inmunes, se hacen reaccionar con colorantes de fluorescencia - de preferencia con fluoresceína-isotiocianato. La purificación posterior del producto de la reacción se realiza predominantemente por medio de filtración a través de gel y por medio de la cromatografía
15 con intercambiadores de iones, sobre dietil-aminoetil-celulosa. Con ello se aíslan las inmunoglobulinas conjugadas con fluoresceína.

 Este procedimiento tiene el inconveniente de que el intento de eliminación del colorante no combinado covalentemente a partir del preparado de proteínas
20 conjugados con fluoresceína, por medio de filtración a través de gel o por diálisis, se observa una separación incompleta del colorante, en especial el colorante unido por adsorción con la proteína, o el colorante unido por
25 un enlace covalente débil, separable con relativa facili-

dad por hidrólisis, no se elimina. Además de ello, el colorante, que a causa de su homopolimerización u homocóndensación alcanza pesos moleculares elevados, es asi mismo eliminado sólo de un modo incompleto.

5 La utilización de tales preparados, que contienen colorante libre, conduce a tinciones de fluorescencia no específicas en el preparado microscópico, y por consiguiente a afirmaciones falsas.

10 En el caso del procedimiento utilizado pre predominantemente según el estado actual de la técnica para la obtención de la fracción de proteínas conjugada que contiene anticuerpos, por medio de cromatografía con intercambiadores de iones sobre dietil-aminoetil-celulosa, se obtiene en lo esencial sólo la porción de anticuerpos
15 que pertenecen a la clase IgG. En las condiciones de elu ción y de separación utilizadas para ello, los anticuerpos de las clases IgG e IgA son desprendidos sólo de un modo incompleto o no lo son en absoluto, por lo que el pre parado obtenido tienen en parte una pérdida considerable
20 de anticuerpos específicos deseados. En el caso de modi ficación de las condiciones de elución para la obtención de anticuerpos IgM e IgA conjugados con fluoresceína, se eluyen simultáneamente las llamadas γ -globulinas "sobre-
25 marcadas" así como también proteínas basófilas. A causa de su carácter fuertemente ácido, estas porciones de pro-

teínas llamadas "sobremarcadas" conducen, en el caso de reacciones inmunológicas, a la fijación no específica con una serie de proteínas básicas en el material investigado, y por consiguiente asimismo a interpretaciones erróneas de la fluorescencia obtenida.

5

El procedimiento según la invención no tiene los inconvenientes mencionados. La purificación electroforética, llevada a cabo en un vehículo inerte, de preparados de proteínas conjugados con un colorante, de preferencia de preparados de proteínas conjugados con fluoresceína, después de la reacción de conjugación, ofrece las ventajas siguientes:

10

1ª.- El procedimiento hace posible una obtención óptima, "a la medida", de zonas que contienen anticuerpos. Las fracciones de proteínas y material inerte, indeseadas, por ejemplo exentas de anticuerpos, pueden ser desechadas sin dificultades, durante la eliminación de la fracción deseada. El rendimiento de preparados de proteínas conjugados con colorantes, que contienen anticuerpos, es óptimo. En el ejemplo expuesto de la fracción de γ -globulina marcada con fluoresceína se recupera 70-90 % de la cantidad utilizada.

15

20

25

2^a.- A causa de la conjugación de proteínas con moléculas orgánicas ácidas, el punto isoeléctrico cambia hacia valores bajos con todas las proteínas que han entrado en reacción con las moléculas orgánicas, con la consecuencia de que, en las condiciones de la electroforesis, éstas emigran hacia el ánodo más intensamente que las proteínas no conjugadas. La eliminación de las proteínas que se han hecho demasiado ácidas a consecuencia de una fuerte reacción con la molécula utilizada para la conjugación, no plantea dificultades ningunas, puesto que éstas emigran más fuertemente hacia el ánodo. Este resultado tiene una importancia especial en el caso de las proteínas conjugadas con el colorante ácido de fluorescencia fluoresceín-isotiocianato (sistema quinoide con un grupo carboxilo libre).

3^a.- La eliminación óptima de la molécula orgánica ácida no combinada (o unida por adsorción), cuya presencia en preparados conjugados con fluoresceína conduce a tintaciones de fluorescencia no específicas indeseadas, se garantiza en el caso del procedimiento según la invención. El fundamento de la fácil eliminación de esta porción de colorante consiste en que la molécula ácida, propiamente dicha emigra intensamente hacia el ánodo. La carga por la tensión eléctrica,

5 en las condiciones de la electroforesis preparativa por zonas, conduce a una separación de las moléculas unidas a las proteínas de un modo relativamente débil, y da lugar a una buena calidad de los conjugados de proteínas obtenidos electroforéticamente. En el caso de las proteínas conjugadas con colorante de fluorescencia, se observa un aumento de la estabilidad de tales preparados durante la conservación en solución acuosa, frente a la de los preparados que habían sido obtenidos según el estado actual de la técnica.

10 4ª.- Si como proteínas para la conjugación se utilizan anticuerpos, el procedimiento según la invención permite la obtención de todas las clases de anticuerpos conjugados con colorantes, por ejemplo IgG, IgA, IgM. Esto tiene importancia en especial en el caso de la utilización de anticuerpos obtenidos a partir de sueros de, por ejemplo, 15 hombres, cabras, ovejas, caballos, en los que, además de los anticuerpos de la clase IgG, también los anticuerpos de otras clases de inmunoglobulinas constituyen una proporción relativamente elevada de la cantidad total de anticuerpos. Este factor tiene también un considerable interés económico, puesto que no se dispone en cantidad ilimitada de sueros que contienen anticuerpos.

20 Transferido a la purificación de anticuerpos conjugados con colorantes de fluoresceína, el procedimiento se-

5 gún la invención conduce a un aumento de la relación de anticuerpos específicos (Ab) a proteínas totales (P), es decir el llamado cociente Ab/P, lo que da lugar a un aumento de la fluorescencia específica deseada.

10 5ª.- El procedimiento, que prescinde del empleo de agentes auxiliares cromatográficos caros, constituye un abaratamiento esencial en la preparación de conjugados de proteínas puros. El material de vehículo inerte utilizado puede ser usado repetidas veces.

15 Como procedimiento electroforético se prefiere la electroforesis sobre vehículo, en especial la electroforesis que contiene el vehículo inerte en una cuba horizontal. En el caso de utilización de, por ejemplo, granulado de poli(cloruro de vinilo) como material de vehículo, se puede en este caso, después de la separación de las fracciones de proteínas conjugadas con fluoresceína, que contienen anticuerpos, separar por corte el preparado deseado correspondientemente a las bandas visibles, y después de ello extraerlo del vehículo por elución con disolventes sencillos.

25 Si el conjugado no está coloreado, se puede identificar indirectamente la posición de las proteí-

nas, de los participantes en la reacción y del conjugado de proteínas, por ejemplo sobre un calco por superposición de papel, que a continuación es teñido por los métodos conocidos.

5

Materiales de vehículo electroforéticos utilizados frecuentemente son, junto al poli(cloruro de vinilo), poliacrilamida, celulosa, almidón, perlas o glóbulos de vidrio, arena, por citar algunos ejemplos, pero sin que según la invención haya que limitarse a ellos.

10

Sin embargo, según la invención, se pueden utilizar también disposiciones de electroforesis según un tipo constructivo vertical, con y sin material de vehículo. Se obtienen también muy buenos efectos de purificación con aparatos de electroforesis de funcionamiento continuo.

15

Según el presente procedimiento son separados preparados de anticuerpos de cualquier origen, que han sido combinados covalentemente con colorantes de carácter ácido. Un colorante especialmente adecuado es en este caso fluoresceín-isotiocianato.

20

Sin embargo, también se pueden hacer reaccionar con proteínas colorantes no fluorescentes, y las proteínas teñidas como consecuencia de la reacción de conjugación pueden ser separadas por el presente procedimiento, siempre que los colorantes utilizados tengan un com-

25

portamiento diferente de emigración electroforética.

5 En lugar de anticuerpos se pueden utilizar también otras proteínas de origen animal, vegetal o microbiano, si éstas, como conjugados, tienen una propiedad electroforética que se diferencia de la de la proteína de partida y de la de la molécula orgánica utilizada para la conjugación. De preferencia, se utilizan como moléculas orgánicas para la conjugación los compuestos cuyos puntos isoeléctricos están en el margen ácido de
10 pH.

La característica esencial del procedimiento propuesto consiste en la utilización de procedimientos de electroforesis preparativa para la preparación de conjugados de proteínas puros, en especial de fracciones
15 de gamma-globulina que se han hecho reaccionar con colorantes de fluorescencia. En el caso de la reacción de fracciones de gamma-globulina con los colorantes de fluorescencia habituales no es de esperar ningún producto electroforéticamente homogéneo, puesto que, como es
20 sabido, es diversa la estructura de las clases de inmunoglobulinas que entran en consideración para la reacción, y muchísimo más cuanto que éstas poseen un número diferente de grupos amino accesibles para la reacción. Aunque en el caso de procedimientos electroforéticos es
25 conocida una zona que se desplaza de modo relativamente

uniforme de gamma-globulinas no reaccionadas, la emigración homogénea de las inmunoglobulinas de las diversas clases, que han reaccionado con el colorante, ha de ser considerada como sorprendente. No es de esperar además
5 que los colorantes unidos por adsorción con moléculas de proteína sean separados de la proteína en el campo de potencial eléctrico. Finalmente, no podía esperarse de la intensa unión conocida de los colorantes de fluorescencia con un material intercambiador de iones, tal como en
10 cuentra utilización en el estado actual de la técnica, que el colorante libre manifieste en procedimientos electroforéticos, en especial con utilización del vehículo poli(cloruro de vinilo), un tramo de emigración especialmente grande en comparación con el de los conjugados de
15 proteínas.

Por la utilización del procedimiento de electroforesis conocido de por sí se obtiene un producto con una pureza esencialmente mayor que la del que se puede obtener por cromatografía. El producto obtenido de este modo tiene, como efecto técnico sorprendente,
20 una especificidad mayor en su utilización como reactivo inmunológico que la del producto según el estado actual de la técnica.

A continuación, la invención se explicará más detalladamente con ayuda de ejemplos de realización.
25

Ejemplo 1

Una solución al 3% de proteínas de suero de cabra, que contiene anticuerpos, se hace reaccionar con fluoresceín-isotiocianato de modo conocido, en medio alcalino. El antisuero conjugado es separado en un aparato de electroforesis horizontal (dimensiones: longitud = 65,0 cm, anchura = 76,0 cm, altura = 1,2 cm), que contiene 3,6 litros de poli(cloruro de vinilo) en forma de polvo (Geon X 427 de la firma Serva, Heidelberg), a un valor de pH de 8,1, con una intensidad de campo de 6 V por cm, una intensidad de corriente de 0,6 A, durante un tiempo de funcionamiento de 15 horas. La fracción de γ -globulina que contiene anticuerpos, que sin conjugación con fluoresceín-isotiocianato permanece por regla general en la ranura de aplicación o incluso emigra hacia el cátodo, ha emigrado claramente en dirección al ánodo. La coloración de amarillo claro a verdoso de la fracción de γ -globulina que contiene anticuerpos se destaca claramente de las demás fracciones de proteínas y de las porciones de colorante libre, que están coloreadas de amarillo oscuro a pardo rojizo. La deseada fracción de γ -globulina que contiene anticuerpos, con un cociente F/P* óptimo, que por lo demás puede ser determinada por bandas inmediatamente después de la separación, es separada por corte como zona de poli(cloruro de vinilo) y extraída del

*F/P = relación del colorante de fluorescencia unido a proteína.

vehículo por lavado con solución de sal común al 0,9 por ciento. El eluato se concentra por ultrafiltración a aproximadamente 1 g % de proteínas.

5 Después de ello pueden efectuarse el ajuste final y los controles de calidad.

En el caso de utilización de 3,6 g de una solución de proteínas que contiene anticuerpos, conjugada con fluoresceína (120 ml de antisuero), se obtienen 0,5 g de una fracción de γ -globulina que contiene anticuerpos, conjugada con fluoresceína.

10

Si se utilizan proteínas de suero de conejo, que contienen anticuerpos, en el caso de la utilización de 8 g de un antisuero que contiene anticuerpos, conjugado con fluoresceína (120 ml) se obtiene 1,0 g de una fracción de γ -globulina que contiene anticuerpos, conjugada con fluoresceína.

15

Rendimientos similares se obtienen también en el caso de la obtención de anticuerpos a partir de sueros humanos. De la consideración de que la proporción de la fracción de γ -globulina en un antisuero constituye aproximadamente 15 a 18 %, los rendimientos, referidos a esta fracción de γ -globulina, han de ser considerados como óptimos.

20

Ejemplo 2

25 Una solución al 3 por ciento de transfe-

rrina humana se hace reaccionar en medio alcalino, de modo conocido, con fluoresceín-isotiocianato. La proteína conjugada se separa en un aparato de electroforesis horizontal (dimensiones, longitud = 75,0 cm, anchura = 76,0 cm, altura 1,2 cm), con una capacidad de 3,6 litros de poli(cloruro de vinilo) en forma de polvo (Geon X 427 de la firma Serva, Heidelberg), con un valor de pH de 8,1, una intensidad de campo de 6 V por cm, y una intensidad de corriente de 0,6 A, durante un tiempo de funcionamiento de 15 horas. El conjugado de transferrina ha emigrado claramente en dirección al ánodo. La coloración de pardo amarillo de la zona que contiene transferrina se destaca claramente de las porciones de colorante libres que están coloreadas de un modo diferente, y que han emigrado todavía más hacia el ánodo. El conjugado de transferrina, con un cociente F/P óptimo, que por lo demás puede ser determinado por bandas inmediatamente después de la separación, es separado por corte como zona de poli(cloruro de vinilo) y extraído del vehículo por medio de lavado con solución de sal común al 0,9 por ciento. El eluato es concentrado por ultrafiltración a aproximadamente 1 g % de proteínas.

Después pueden efectuarse el ajuste final y los controles de calidad.

En el caso de utilización de 3,6 g de trans

rrina humana, se obtienen aproximadamente 3,0 g de la correspondiente proteína conjugada con fluoresceína.

5 La presente solicitud que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, con fecha 2 de Julio de 1974, bajo el número P 24 31 719.9, se ajusta a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

REIVINDICACIONES

15

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20 1ª.- Procedimiento para la purificación de conjugados de proteínas, que se diferencian en sus propiedades electroforéticas de los compuestos orgánicos utilizados para la conjugación, caracterizado porque, para la separación de subproductos indeseados y de participantes en la conjugación que no han reaccionado, el con-
25 jugado bruto es sometido a una electroforesis preparativa.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque son purificadas fracciones de gamma-globulina que contienen anticuerpos, conjugadas con colorantes.

5

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque son purificadas fracciones de gamma-globulina que contienen anticuerpos, conjugadas con colorantes de fluorescencia.

10

4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª - 3ª, caracterizado porque los procedimientos electroforéticos son utilizados con vehículos inertes.

5ª.- Procedimiento para la purificación de conjugados de proteínas.

15

Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diecisiete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,
P.A.

27 ENE. 1976

20

Fernando de Elzaburo
Por Poder.

21.1.76
ACM.