



440616

P.- 61.251

Hoe 72/B 007 - Div. II

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.: C07G

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA DEMOSTRACION "IN VITRO" DE
GLICOPROTEINAS-FA (Fase Aguda)"
(Clase Internacional C07g)

29-8-75

-1-



- 1

Objeto del invento son glicoproteínas-FA y un procedimiento para el aislamiento de éstas.

Ya se ha propuesto un procedimiento para el --
aislamiento de una β_1 -glicoproteína específica del emba-
razo. En esta propuesta, no obstante, no se hizo menció
a que durante el embarazo aparecen otras dos glicoproteí
nas, las cuales, no obstante, no son específicas del em-
barazo, ya que aparecen también en el suero de pacientes
que tienen enfermedades de diversos orígenes. A causa de
esta aparición tanto en el embarazo como en el caso de --
enfermedades son denominadas glicoproteínas-FA (FA = Fa-
se Aguda).

Se ha encontrado que se pueden aislar estas --
dos glicoproteínas-FA a partir de placentas o de la san-
gre de mujeres embarazadas.

Por lo tanto, son objeto del invento las dos --
glicoproteínas.

La β_1 -glicoproteína-FA, caracterizada por una
velocidad de desplazamiento electroforético en el gel de
agar dentro del margen de las β_1 -globulinas y por un pe-
so molecular de aproximadamente 100.000 ($\pm 10\%$), y la --
 α_2 -glicoproteína-FA, caracterizada por una velocidad de
desplazamiento electroforético en el gel de agar dentro
del margen de las α_2 -glicoproteínas y un peso molecular
de aproximadamente 300.000 ($\pm 10\%$).



El hecho de que las glicoproteínas-FA tienen un mayor contenido de carbohidratos se deduce de la modificación de su movilidad electroforética en el tratamiento con neuraminidasa. Después de la separación del ácido neurámico la β_1 -glicoproteína-FA muestra la movilidad de una gamma-globulina, y la α_2 -glicoproteína-FA muestra la movilidad de una β_1 -globulina.

Un desplazamiento tan intenso lo muestran en general sólo plasmaproteínas que contienen al menos 2-6% de ácido neurámico o 10-30% de carbohidratos.

La velocidad de desplazamiento en un gel de poliacrilamida (con 5,5% de acrilamida a pH 8,5 en el tampón de tris-(hidroximetil)-aminometano-citrato-borato, Z. clin. Chem. 4, 58 (1966)) es de 62 para la β_1 -glicoproteína-FA y de 32 para la α_2 -glicoproteína-FA, si se establece con un valor de 100 la velocidad de desplazamiento de la albúmina humana.

Es objeto del invento además un procedimiento para el aislamiento de estas dos glicoproteínas-FA, el cual está caracterizado porque se fraccionan de acuerdo con métodos de por sí conocidos placentas o sangre de mujeres embarazadas.

Para el aislamiento de las glicoproteínas-FA, placentas desmenuzadas pueden ser sometidas a extracción con una solución de sal débil fisiológicamente compati-



ble, por ejemplo de cloruro sódico. A partir del extracto se puede separar un precipitado previo inactivo con lactato de diaminoetoxiacridina a un pH débilmente ácido, y a continuación en un margen de pH alcalino precipitar las dos glicoproteínas de nuevo mediante precipitación con lactato de diaminoetoxiacridina. Para la separación del precipitado previo, el lactato de diaminoetoxiacridina es aconsejado preferiblemente en forma de solución acuosa en una cantidad de 5 a 10% en peso, calculado con respecto al contenido proteínico del extracto. Para la precipitación principal, que convenientemente tiene lugar en un margen de pH entre 7,5 y 9,0, se aconseja una cantidad de lactato de diaminoetoxiacridina de 10 a 30%, -- calculado con respecto al contenido proteínico del extracto. Para la purificación ulterior es apropiada la filtración a través de gel con dextrano reticulado, por ejemplo Sephadex G-150 y/o la electroforesis en zonas preparativa.

La filtración a través de gel se lleva a cabo después de diálisis frente a una solución tampón débil, por ejemplo 0,01 molar, de tris-(hidroximetil)-aminometano y ácido clorhídrico con un pH de 7,5 a 8,5 preferiblemente de pH 8,0, en dextrano reticulado tal como Sephadex G-150. Para la solución puede servir por ejemplo tampón 0,1 molar de tris-(hidroximetil)-aminometano y ácido



clorhídrico, el cual contiene además 1 mol por litro de
cloruro de sodio. En este proceso de elución se eluye en
primer término la α_2 -glicoproteína-FA, mientras que la
 β_1 -glicoproteína-FA sale sólo más tarde de la columna.
5 La α_2 -glicoproteína-FA es eluida inmediatamente des-
pués de la α_2 -macroglobulina y la β_1 -glicoproteína-FA
es eluida inmediatamente después de la 7S-gamma-globuli-
na.

10 Ambas proteínas son precipitadas mediante sul-
fato amónico (aproximadamente 2-2,5 moles por litro). --
Después de la disolución de ambos precipitados en agua -
destilada las soluciones son dializadas frente a una so-
lución tampón tal como bicarbonato de amonio de pH 8,0 a
8,5 y son separadas convenientemente de modo adicional -
15 con el mismo tampón en la electroforesis en zonas prepa-
rativa. Las correspondientes zonas en el margen α_2 o en
el margen β_1 son eluidas con bicarbonato de amonio y se
cadas por congelación.

20 Para el aislamiento de las dos glicoproteínas-
-FA desde el suero, los productos del procedimiento son
precipitados en el margen de pH alcalino (pH 8-9) con --
lactato de diaminoetoxiacridina a partir de suero retro-
placentario. El complejo con acridina es mezclado con so-
lución de cloruro de sodio, por ejemplo con una solución
25 al 4-6%, preferiblemente al 5%, el precipitado resultante



es separado y desechado, y la porción sobrenadante es --
precipitada con sulfato de amonio sólido (2-2,5 moles/li-
tro).

5 Para la separación de las dos glicoproteínas-FA
se puede utilizar también en este caso la filtración a -
través de gel, siendo eluida la α_2 -glicoproteína-FA des-
pués de la α_2 -macroglobulina, y siendo eluida la β_1 -gli-
coproteína-FA después de la γ -gammaglobulina. A continua-
ción, - tal y como ya se ha descrito en el caso del ais-
10 lamiento desde placenta -, se realiza una electroforesis
en zonas preparativa. Los pesos moleculares son determi-
nados por su comportamiento en el caso de la filtración
a través de gel.

15 Las glicoproteínas-FA aisladas de acuerdo con
el invento sirven para la obtención de antisueros. Con -
éstos, a su vez, se puede determinar el estado de una en-
fermedad y vigilar el transcurso de enfermedades por me-
dio de métodos inmunológicos (ensayo de difusión a tra--
vés de gel, electroforesis de desplazamiento superior, -
20 determinación radioinmunológica).

La detección inmunológica de las glicoproteí-
25 nas-FA es importante para la diagnosis diferencial, dado
que en diferentes enfermedades existen diferencias cuali-
tativas y cuantitativas en la aparición de estas proteí-
nas. Además de ello, su determinación inmunológica puede



ser utilizada para la vigilancia de la terapia. La detección se lleva a cabo con suero del paciente.

Ejemplo 1.

Aislamiento a partir de suero retroplacentario.

5 500 ml de suero retroplacentario son diluidos
con 500 ml de agua destilada y son precipitados a pH 8,5
(solución 0,1 N de cloruro de sodio) con 350 ml de una
solución al 3% de lactato de diaminoetoxiacridina. El
precipitado es separado por centrifugación y mezclado
10 con 500 ml de solución al 5% de cloruro de sodio, precipitando el derivado de acridina. El derivado de acridina
separado es centrifugado, la porción sobrenadante es pre
cipitada por adición de 30 g de sulfato de amonio sólido
por 100 ml. El precipitado obtenido contiene las dos gli
15 coproteínas-FA. Estas, después de disolver en agua, son
separadas por filtración a través de gel en Sephadex G-
150 en fracciones cada una de 20 ml (columna 10 x 100 cm).
Para la elución sirve tampón 0,1 molar de tris-(hidroxi-
metil)-aminometano y ácido clorhídrico de pH 8,0, que
20 contiene además 1,0 moles/litro de cloruro de sodio. Las
fracciones son ensayadas con antisueros específicos de
conejos (ensayo de difusión a través de gel de acuerdo
con Ochterony).

25 Las correspondientes fracciones, en las que se
detectaron los dos productos del procedimiento, son en



5 cada caso reunidas, precipitadas con 30 g de sulfato de amonio por 100 ml de solución, dializadas frente a solución 0,075 molar de bicarbonato de amonio y separadas -- por electroforesis preparativa para la ulterior purificación. Para ello se hace uso del poli(cloruro de vinilo) como soporte y de una solución al 0,075 % de bicarbonato de amonio como tampón.

10 Las glicoproteínas-FA son eluidas con el mismo tampón desde las correspondientes zonas, es decir el margen ξ_1 y el margen α_2 de las globulinas, y los eluatos son liofilizados a continuación. En la electroforesis -- preparativa la α_2 -glicoproteína-FA se encuentra en la fracción α_2 y la ξ_1 -glicoproteína-FA se encuentra en la fracción ξ_1 .

15 Ejemplo 2.

Aislamiento desde placentas.

20 10 kg de placentas humanas son desmenuzados en estado congelado a baja temperatura y son extraídos con 10 litros de una solución al 0,5 % de cloruro de sodio -- (durante 1 hora a 5-10°C). 10 litros de la solución de -- extracción son ajustados a pH 6,0 con ácido acético al -- 20% y mezclados en primer término con 1500 ml de una solución al 3% de lactato de diaminoetoxiacridina. El precipitado previo inactivo es separado por centrifugación
25 y desechado. La porción sobrenadante es ajustada a pH 8,5



con solución 2 N de hidróxido de sodio y es precipitada con 3 litros de la solución al 3% de sal de acridina. El precipitado, que contiene las glicoproteínas-FA, es descompuesto con 6 litros de una solución al 5% de cloruro de sodio de modo correspondiente al Ejemplo 1. Después de centrifugación se agrega a la porción sobrenadante 30% de sulfato de amonio sólido. El precipitado, que se obtiene mediante filtración, es disuelto en agua y dializado frente a una solución 0,01 molar de tris-(hidroximetil)-aminometano y ácido clorhídrico (pH 6,0). Para la eliminación de gamma-globulina y hemoproteínas, la solución es mezclada con agitación con 150 g de carboximetilcelulosa húmeda y a continuación es filtrada. A partir de filtrado se aíslan las glicoproteínas-FA mediante precipitación con sulfato de amonio (al 30% en peso/volumen). El precipitado es disuelto en agua, y desdoblado y purificado de acuerdo con el Ejemplo 1 mediante filtración a través de gel y electroforesis en zonas preparativa. El rendimiento es de 15 mg de la β_1 -glicoproteína-FA y de 5 mg de la α_2 -glicoproteína-FA.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en la República Federal Alemana, el 29 de Abril de 1972, bajo el N^o P 22 21 261.9, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



REIVINDICACIONES

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

10 1ª.- Procedimiento para la demostración "in vi-
tro" de glicoproteínas-FA (Fase Aguda), caracterizado por
que se hace reaccionar suero de la persona sometida a ex-
perimentación con un antisuero preparado administrando
parenteralmente a un animal de ensayo una glicoproteína-
-FA, sea la β_1 -glicoproteína-FA (Fase Aguda) y la α_2 -gli-
15 coproteína-FA, teniendo la primera una velocidad de des-
plazamiento electroforético en el gel de agar en el mar-
gen de las β_1 -globulinas y un peso molecular de aproxima-
damente 100.000, y la segunda una velocidad de desplaza-
miento electroforético en el gel de agar en el margen de
20 la α_2 -glicoproteínas y un peso molecular de aproximada-
mente 300.000, cuyas glicoproteínas-FA se han obtenido
por fraccionamiento de placentas o sangre de mujeres em-
barazadas según métodos de por sí conocidos, sacándole
sangre al animal de ensayo después de la formación del
25 anticuerpo correspondiente, y obteniendo a partir de ella



el suero.

2.- Procedimiento para la demostración "in vi
tro" de glicoproteínas-FA (Fase Aguda).

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-
tecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de once hojas escritas a má-
quina por una sola cara.

Madrid,

- 1 SET. 1975

10

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder

29-8-75

- 11 -

lfg.