



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO 21 480.624	10 A1
	22 FECHA DE PRESENTACION 16.5.79	

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con las leyes que figuran en la presente publicación y según el contenido de la Memoria adjunta.

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 2163/78		32 FECHA 17.5.78	33 PAIS Dinamarca
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 39/00	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	
54 TITULO DE LA INVENCION "UN METODO PARA PRODUCIR ANTISUEROS O ANTICUERPOS CONTRA UNA GLICOPROTEINA ASOCIADA CON EL CANCER"			
71 SOLICITANTE (S) A/S ALFRED BENZON			
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Halmtorvet 29, DK-1700 Copenhagen V, Dinamarca			
72 INVENTOR (ES) Kurt Bækgaard Oster y Kurt Frimann Berg			
73 TITULAR (ES)			
74 REPRESENTANTE D. FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 71.989)			

La presente invención concierne a un método para la preparación de antisueros o anticuerpos contra una glicoproteína asociada con el cáncer.

La patente de Estados Unidos número 4.132.769 (que corresponde a la solicitud de patente alemana número P 25 48 636.6) describe una proteína asociada con el cáncer, denominada Cl IAC. La Cl IAC se describe como una glicoproteína asociada con el cáncer, que muestra actividad inactivadora de Cl (actividad inhibidora de la esterasa Cl) y que tiene un peso molecular de 110.000-130.000 Daltons, determinada mediante filtración por gel, y una constante de Swedberg de 6,2S, determinada mediante ultracentrifugación. La Cl IAC se encontró en los fluidos de la pleura y de las ascitis de los pacientes de cáncer, en el suero procedente de pacientes de cáncer y en otros fluidos fisiológicos procedentes de pacientes de cáncer y, también, en medios de cultivo de células cancerosas humanas cultivadas.

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que una proteína purificada, que muestra los mismos determinantes inmunológicos que la Cl IAC (en otras palabras, que es capaz de precipitar con anticuerpos, tal como se describe en la patente de Estados Unidos número 4.132.769, dirigidos específicamente contra la Cl IAC y capaz de inmunizar animales no humanos específicamente inmunizables, tales como cerdos de la raza Danish Landrace y ovejas, para producir anticuerpos específicos para la Cl IAC, tal como se describe en la patente de Estados Unidos número 4.132.769) puede obtenerse, haciendo pasar una solución que contiene la Cl IAC, a través de una columna de cromatografía de afinidad de anticuerpos, que comprende anticuerpos inmovilizados en matriz, dirigidos específicamente contra la

1 C1 IAC, y eluyendo la columna por medio de un detergente.

5 La proteína purificada eluida de esta manera (denominada en lo que sigue CaDet) puede caracterizarse, porque precipita con inmunoglobulinas dirigidas específicamente contra el inactivador C1 asociado con el cáncer, C1 IAC, que se define en la patente de Estados Unidos número 4.132.769 arriba mencionada, y porque muestra, en un gel de gradiente de electroforesis por gel de poliacrilamida y de-
10 decilsulfato sódico (SDS PAGE), esencialmente sólo una banda bien definida, a unos 25.000 Daltons.

15 El hecho de que la proteína muestre esencialmente sólo una banda bien definida en un gel de gradiente de SDS PAGE (que corresponde a 95-99 por ciento, usualmente por lo menos 98 por ciento, de la proteína total presente) se considera, de acuerdo con los principios bioquímicos normales, como una prueba de la obtención de una proteína purificada, y "el peso molecular" particular encontrado en la SDS PAGE, se considera como una "huella dactilar" característica y ca-
20 rante de ambigüedad, de la proteína en cuestión.

25 La proteína purificada (denominada en lo que sigue CaDet) de la invención, que muestra determinantes inmunológicos reactivos únicamente con anticuerpos contra la C1 IAC, en otras palabras, que muestra determinantes inmunológicos característicos de la C1 IAC, es extremadamente útil como antígeno para la inmunización de animales específicamente inmunizables, a fin de producir anticuerpos específicos dirigidos contra la C1 IAC (y, de manera inherente, di-
30 rigidos también contra la CaDet). En tal producción de anticuerpos dirigidos contra la C1 IAC, las ventajas del uso de la nueva proteína CaDet, son, en particular, que, debido al

1 uso del antígeno purificado, se obtiene en la inmunización
una concentración o título mucho más alto del anticuerpo mo
noespecífico (específico para la C1 IAC y, de manera inhe-
rente, también para la CaDet). Por consiguiente, la nueva
5 proteína CaDet constituye un importante progreso en la pre-
paración de cuerpos específicos para la C1 IAC. Los anti-
cuerpos más específicos y más sensibles, que pueden obtener
se cuando se utiliza CaDet para la inmunización de animales
específicamente inmunizables, proporcionan ventajas conside-
10 rables para el uso diagnóstico de la anti C1 IAC. Las mayo-
res especificidad y sensibilidad (avidez) de las inmunoglo-
bulinas anti C1 IAC preparadas mediante la utilización de
la CaDet como antígeno inmunizador, permiten la detección
de concentraciones menores de C1 IAC en los sueros proceden-
15 tes de pacientes cancerosos.

Aparte de su utilidad como antígeno, para la inmu-
nización de animales, la CaDet puede utilizarse también pa-
ra la normalización de ensayos anti C1 IAC, y como reactivo
en ensayos de hemoaglutinación, y en ensayos radioinmunoló-
20 gicos.

Los anticuerpos cultivados contra la CaDet, por
ejemplo en la oveja o en los cerdos, tal como se describe
en la patente de Estados Unidos número 4.132.769 anterior-
mente mencionada, pueden prepararse, para uso diagnóstico,
25 de la misma manera que se ha descrito en dicha patente de
Estados Unidos número 4.132.769. Así, por ejemplo, los anti-
cuerpos pueden ser incorporados a un gel de agarosa, con
orificios punzonados en el gel para la aplicación de mate-
rial del cual se sospecha que contiene C1 IAC (técnica de
Manzini). Asimismo, por ejemplo, pueden efectuarse ensayos

1 RIA, utilizando bien sea CaDet marcada con isótopos radioac-
tivos para la absorción del anticuerpo, o bien anticuerpo
2 marcado con isótopo radiactivo para la absorción de la
CaDet, de acuerdo con los principios convencionales del
5 RIA. Asimismo, pueden utilizarse métodos de ensayo que uti-
lizan la técnica de la hemoaglutinación, de acuerdo con los
cuales se aplica la CaDet a hematies (o partículas de látex
o similares), y se aplica el anticuerpo. Como se sabe de un
modo general, es preferible efectuar los ensayos de hemo-
10 aglutinación y las reacciones análogas, con antígeno o anti-
cuerpo monoespecífico, puros.

Otra utilidad de los anticuerpos cultivados con-
tra la proteína purificada CaDet de la presente invención,
es para la administración a seres humanos con fines tera-
15 péuticos de diversas enfermedades cancerosas. Con este fin,
se cultivan los anticuerpos en cerdos, por ejemplo, en cer-
dos de la raza Danish Landrace, y el antisuero obtenido del
cerdo inmunizado, se somete a un fraccionamiento del suero,
para obtener su fracción de inmunoglobulina IgG sustancial-
20 mente pura, ya que se ha encontrado (véase la patente de Es-
tados Unidos número 4.132.769) que las inmunoglobulinas IgG
del cerdo son toleradas por los seres humanos, a causa de
que aquéllas no inmunizan a los seres humanos por adminis-
tración parenteral.

25 Una utilidad adicional de los anticuerpos cultiva-
dos contra la CaDet, es como anticuerpos en la cromatogra-
fía de afinidad de anticuerpos para la preparación de CaDet
a partir de fluidos que contienen C1 IAC.

Como se ha indicado arriba, la CaDet puede prepa-
rarse a partir de una solución que contiene C1 IAC, mediante
30
08069

1 una técnica de cromatografía de afinidad de anticuerpos, y
mediante elución con un detergente. El peso molecular SDS
PAGE de aproximadamente 25.000 Daltons, difiere considera-
blemente del peso molecular de 110.000 a 130.000 Daltons,
5 determinado por filtración por gel, que se indica en la pa-
tente de Estados Unidos número 4.132.769. Sin embargo, el
hecho de que la proteína, una vez purificada, deja una "hue-
lla dactilar" en un gel de gradiente de acrilamina SDS PAGE,
a un peso molecular particular, no implica necesariamente
10 que la proteína, en su forma nativa, tenga el mismo peso mo-
lecular.

El peso molecular de unos 25.000 Daltons que se
encuentra en el gradiente SDS PAGE, comparado con el peso
molecular de 110.000 a 130.000 Daltons, encontrado anterior-
mente mediante filtración por gel de la proteína C1 IAC, po-
dría indicar que la CaDet es un producto de descomposición
15 del inactivador C1 asociado con el cáncer, nativo (C1 IAC),
habiendo sido formado dicho producto de descomposición, por
ejemplo, a causa de tratamientos con detergente en la etapa
de elución y/o a causa del tratamiento con SDS, y habiendo
retenido aquél los determinantes inmunológicos de la C1 IAC,
20 o bien podría indicar que la C1 IAC, tal como se describe
en la patente de Estados Unidos número 4.132.769, no es una
proteína pura, sino que es más bien un conglomerado de va-
rias proteínas que muestran un efecto inhibidor de la este-
25 rase C1.

Una filtración por gel de la C1 IAC cruda sobre
Sephacryl S-200, en Triton X-100 al 1 por ciento, tampón de
fosfato, solución salina (PBS) (pH = 7,2), cloruro sódico
30 1 M, dio como resultado la elución de tres picos que precipi-

1 tan con anti C1 IAC como se describe en la patente de Esta-
dos Unidos número 4.132.769, correspondiendo un pico a un
peso molecular de 90.000 a 100.000 Daltons, correspondien-
do otro a 50.000-55.000 Daltons, y correspondiendo un ter-
5 cero a 25.000-30.000. Esta filtración por gel se describe
con mayor detalle en la sección experimental. El peso mole-
cular encontrado mediante esta filtración por gel, parece-
ría ajustarse a la presunción de que la C1 IAC es un con-
glomerado de varias unidades.

10 Sin embargo, independientemente del carácter exac-
to de la relación químico-proteica entre la C1 IAC y la
CaDet, se ha encontrado que la CaDet, tal como se ha expli-
cado arriba, es un antígeno extremadamente valioso para pro-
ducir anticuerpos monoespecíficos de alto título contra la
15 C1 IAC, mostrando tales anticuerpos la misma utilidad que
la anti C1 IAC descrita en la patente de Estados Unidos nú-
mero 4.132.769, pero con la ventaja adicional de su mayor
título y de su carácter altamente monoespecífico.

20 La presente invención se refiere también a un mé-
todo para preparar una proteína (CaDet) que precipita con
anticuerpos específicos para la C1 IAC (tal como se descri-
be en la patente de Estados Unidos número 4.132.769) y que
muestra el modelo de gel de gradiente de acrilamida SDS PAGE,
arriba mencionado, apareciendo del 95 al 99%, usualmente por
25 lo menos el 98%, de la proteína, como una banda única a unos
25.000 Daltons, comprendiendo dicho procedimiento someter
una solución que contiene un componente que precipita con an-
ticuerpos dirigidos específicamente contra la C1 IAC, a una
cromatografía de afinidad de anticuerpos, utilizando anti-
30 cueros inmovilizados en matriz dirigidos específicamente

1 -contra la C1 IAC, y eluyendo la CaDet unida al anticuerpo.
Esta cromatografía de afinidad de anticuerpo se efectúa ade-
cuadamente, utilizando una columna de los anticuerpos inmo-
vilizados en matriz, de una manera en sí conocida. La pre-
5 sencia de la CaDet en el eluato puede demostrarse por medio
de la anteriormente mencionada electroforesis con gel de
gradiente SDS PAGE sobre el eluato, de acuerdo, por ejemplo,
con el método descrito en la siguiente sección experimental,
y la vigilancia de la elución de la CaDet se efectúa adscua-
10 damente mediante espectrofotometría, para determinar la pre-
sencia de proteína en el eluato. La actividad de C1 IAC de
las fracciones de eluato se determina, adecuadamente, me-
diante ensayos de inmunoprecipitación, por ejemplo, midien-
do el diámetro del anillo de precipitación en un ensayo Man-
15 zini, utilizando anti C1 IAC tal como se describe en la pa-
tente de Estados Unidos número 4.132.769 arriba mencionada.

Se establecen unas condiciones adecuadas para la
carga de la columna, de acuerdo con los principios muy cono-
cidos de la cromatografía de afinidad de anticuerpos, y un
20 ejemplo de condiciones adecuadas aparece en la sección expe-
rimental siguiente. Las condiciones para eluir la columna
están destinadas a eluir la proteína CaDet, tal como se ha
caracterizado arriba, y se ha encontrado que un tampón ade-
cuado es aquel que contiene 0,1% de Triton X-100, cloruro
25 sódico 1 M y PBS de pH 7,2. No existe ninguna razón para
creer que el Triton X-100 sea el único detergente que es ca-
paz de eluir la C1 IAC desde la columna, sin destruir el an-
tígeno (o la columna de anticuerpo), y se halla dentro del
alcance de esta invención, el utilizar otros detergentes de
30 tipo iónico, tales como el dodecilsulfato sódico (SDS) o de

1 tipo no iónico, para la elución de la CaDet desde la colum-
na.

La solución aplicada a la columna y que contiene un componente que precipita con anticuerpos contra la C1 IAC, puede ser una preparación cruda que contiene C1 IAC tal como fluido de pleura o de ascitis procedente de pacien-
5 tes cancerosos, o medio de cultivo procedente del cultivo de células cancerosas humanas, ambos tal como se describen en la patente de Estados Unidos número 4.132.769, arriba
10 mencionada, o bien puede ser, adecuadamente, una prepara- ción parcialmente purificada de la misma, tal como la pre- paración purificada por cualquiera de los métodos de adsor- ción y de filtración por gel, descritos en dicha patente de Estados Unidos número 4.132.769, preferiblemente, un pro-
15 ducto preparado por el método "Sephadex"^(R) A50"), descrito en la patente de Estados Unidos número 4.132.769, el cual método comprende adsorber el material que contiene la C1 IAC con un cambiador de aniones (por ejemplo, "Sephadex"^(R)
20 A50") y precipitar el material que contiene C1 IAC proceden- te del eluato, desde el cambiador de aniones, dializar el precipitado, disolverlo en solución de cloruro sódico, y liofilizarlo. Otros materiales de partida que contienen C1 IAC, que son adecuados para utilizarlos en la preparación de la CaDet, son el fluido de placenta y los fluidos rela-
25 cionados con la placenta. Se ha encontrado en la placenta una alta concentración de C1 IAC, y dado que la placenta es una fuente de proteínas humanas, de la que se dispone sin ninguna clase de restricciones legales o éticas, la prepara- ción de anticuerpos contra C1 IAC, utilizando, como antígen-
30 no, la C1 IAC derivada de la placenta, preferiblemente, la

1 CaDet preparada a partir de placenta, constituye un impor-
tante aspecto de la presente invención. El hecho de que la
placenta contenga C1 IAC, debe ser tomado en consideración
5 para interpretar el ensayo diagnóstico de muestras proce-
dentes de mujeres embarazadas, por medio de anti C1 IAC cul-
tivada contra C1 IAC o CaDet, pero no está en desacuerdo
con el carácter anteriormente descrito de la C1 IAC como
una proteína asociada a varios tipos de cáncer, en los que
la C1 IAC protege las células cancerosas que crecen como
10 parásitos en el tejido humano, de ser destruidas por el
sistema inmunitario humano. De una manera completamente si-
milar, la C1 IAC puede ser la proteína neutralizadora del
sistema inmunitario, que hace que el feto sea capaz de fi-
jarse al útero, y de crecer en él, sin ser atacado por el
15 sistema inmunitario de la madre.

Al igual que cualesquiera otras mezclas biológi-
cas, a partir de las cuales ha de aislarse una proteína que
está presente en proporciones pequeñas o relativamente pe-
queñas, las soluciones de partida, que contienen C1 IAC,
20 utilizadas para la preparación de la CaDet, que se descri-
ben en esta memoria, se tratan preferiblemente para sepa-
rar, neutralizar o destruir la actividad proteolítica exis-
tente en ellas, por ejemplo, mediante la adición de un des-
tructor de enzimas o inhibidor de enzimas, tales como inhi-
bidor de tripsina de soja, poli-L-lisina, o Trasylol^(R), o
25 haciendo pasar la solución a través de columnas de inhibido-
res de enzimas o destructores de enzimas, inmovilizados, pu-
diendo tratarse las inmunoglobulinas anti C1 IAC, utiliza-
das en la columna de afinidad de anticuerpos, también, antes
30 de su inmovilización o uso, para eliminar de ellas cualquier

1 actividad proteolítica, mediante tratamiento de la misma ma
nera, preferiblemente, haciéndolas pasar a través de una co
lumna de inhibidor de enzimas o destructor de enzimas, inmo
vilizados en matriz.

5 Las inmunoglobulinas anti C1 IAC utilizadas en la
columna de cromatografía de afinidad de anticuerpos, pueden
ser inmunoglobulinas cultivadas de una manera en sí conoci-
da, contra C1 IAC, tal como se describe en la patente de Es
tados Unidos número 4.132.769, arriba mencionada, y, prefe-
10 riblemente, si es necesario, pueden ser absorbidas, de mane
ra que se aumente su especificidad, o pueden ser inmunoglo-
bulinas cultivadas contra CaDet. La inmovilización de las
inmunoglobulinas en una matriz, se efectúa adecuadamente, fi
jando las inmunoglobulinas, covalentemente, a una matriz,
15 tal como agarosa reticulada, por ejemplo "Sepharose^(R) 4B",
de acuerdo con principios muy conocidos. Preferiblemente,
los anticuerpos se fijan hasta tal punto que la cantidad to
tal de anticuerpo fijada covalentemente a la matriz, corres
ponda a, como máximo, el 85% de las inmunoglobulinas utili-
20 zadas en la etapa de fijación covalente. De manera análoga
a lo que se ha descrito en la revista Scand. J. Immunol. 6,
77 - 86 (1977); esto da como resultado la máxima recupera-
ción desde la columna.

25 Para el almacenamiento (preferiblemente a -70°C o
a +4°C) y uso posterior, el eluato que contiene CaDet se
concentra adecuadamente hasta un pequeño volumen, que tiene
una concentración de proteínas del orden de 10 gammas por
ml o superior. Esta operación de concentración puede efec-
tuarse, por ejemplo, mediante conductos de diálisis y saca-
rosa, o mediante una célula de concentración (por ejemplo,

1 Millipore) que tiene un filtro con una fracción de peso mo-
lecular de 10.000 Daltons. La presencia de un detergente en
el eluato, estabiliza la CaDet, la cual, de otro modo, como
cualquier proteína pura en una solución acuosa, tendería a
5 ser inestable. Otros estabilizadores adecuados que pueden
ser utilizados, son el SDS (por ejemplo solución al 0,1 al
0,2%), la albúmina de suero bovino (BSA) (por ejemplo en so-
lución al 1%) u otras proteínas o péptidos, no humanos, ade-
cuados, que no interfieran con el uso a que se destina la
10 CaDet. Alternativamente, puede utilizarse la adición de
aproximadamente un 25% en volumen de etilenglicol.

Para ser utilizada como un antígeno para la inau-
nización de animales, se combina adecuadamente la CaDet,
preferiblemente estabilizada con, por ejemplo, Triton X-100
15 o SDS, con un portador, subsiguientemente a una diálisis
versus, por ejemplo, tampón de fosfato (PB) 20 mmolar, 0,1%
Triton X-100. El portador puede ser, por ejemplo, Blue Dex-
tran 2000 (dextrano de peso molecular aproximadamente
2.000.000, al cual ha sido fijado covalentemente Cibacron
20 F3 GA) y materiales macromoleculares similares, a los que
está unido un ligando que fija proteínas, de acuerdo con el
mismo mecanismo que para el Cibacron F3 GA. Asimismo, es
útil una combinación con coadyuvante de Freund (completo o
incompleto). Para ser utilizada en la inmunización, la
25 CaDet puede fijarse también a otros diversos portadores en
sí conocidos, con fines de inmunización, por ejemplo, PBD,
albúmina procedente de las especies animales inmunizadas,
etc.

La inmunización de animales específicamente inmu-
nizables, por ejemplo, cerdos, se efectúa, adecuadamente,

1 de la misma manera que se ha descrito en la patente de Es-
tados Unidos número 4.132.769 arriba mencionada, y, como
ejemplo, se puede inmunizar un cerdo mediante cuatro inyec-
ciones en el cuello, con un intervalo de unos 14 días, uti-
5 lizando, para cada inyección, una cantidad tan pequeña co-
mo 2 gammas de CaDet, en solución acuosa estabilizada, por
ejemplo, con 0,1% de Triton X-100, combinada con una parte
igual en volumen de coadyuvante de Freund. La vigilancia
del desarrollo de la recogida de antisuero desde el animal,
10 puede efectuarse de acuerdo con los métodos descritos en la
patente de Estados Unidos número 4.132.769, utilizando pre-
feriblemente CaDet como antígeno para vigilar el título de
anticuerpo.

Aunque se ha descrito arriba la cromatografía de
15 afinidad de anticuerpo, utilizando una columna, es evidente
que se puede utilizar para los fines de la presente inven-
ción, cualquier otro método de cromatografía de afinidad de
anticuerpo, utilizando anticuerpo inmovilizado, por ejem-
plo, una operación discontinua o la ejecución de la cromato-
20 grafía en centrifugas, de una manera en sí conocida, y ta-
les equivalentes evidentes se encuentran dentro del alcance
de la presente invención.

Como alternativa de la cromatografía de afinidad
de anticuerpos, se pueden utilizar otros mecanismos de cro-
25 matografía de afinidad, de una manera similar, utilizando
en todos los casos, como material inmovilizado en matriz,
un material por el cual tienen afinidad la C1 IAC y la
CaDet, por ejemplo, enzimas que son inhibidos por la C1 IAC
en particular, proteasas tales como plasmina y esterasa C1
30 activada, y otros materiales por los cuales tiene afinidad

1 la C1 IAC, por ejemplo, lecitinas, tales como Con A, ligan-
dos hidrófobos, Blue Dextran y otros materiales que contie-
nen un ligando del tipo del Cibacron F3 GA, etc.

SECCION EXPERIMENTAL

5 Filtración por gel.

Con el fin de caracterizar adicionalmente la C1
IAC cruda, determinando un peso molecular o sus pesos mole-
culares en un detergente suave, y comparando éste con el
peso molecular de la CaDet, se efectuó una filtración por
10 gel en "Sephacryl G-200" (un gel preparado por reticula-
ción covalente de alildextrano con N,N'-metileno-bis-acri-
lamida, margen de exclusión 5.000 a 200.000 Daltons). El
tampón del gel fue cloruro sódico 1 M, tampón de fosfato
20 milimolar (PB), pH 7,2, que contiene 1 por ciento de
15 Triton X-100. Debe presumirse que los pesos moleculares de
terminados de esta manera, son aproximadamente similares a
los pesos moleculares de las formas nativas de la C1 IAC
cruda.

El experimento se efectuó de la manera siguiente:

20 Se rellenó una columna Pharmacia K: 2,6/100, con
Sephacryl G-200 (diámetro de la columna 2,6 cm, longitud
100 cm) por medio de 2 a 6 volúmenes de lecho de tampón del
gel. Después de añadir otros tres volúmenes de lecho de tam-
pón del gel, se estabilizó la columna. Después, se calibró
25 la columna por medio de 5 marcadores moleculares conocidos,
que tenían pesos moleculares de 12.400, 17.800, 25.000,
45.000 y 67.000, disolviéndose los marcadores en 5 ml de
tampón del gel. Después de la aplicación de los marcadores,
se lavó la columna con tampón del gel. Se recogieron frac-
ciones de 5,3 ml y se determinaron los correspondientes va-
30

1 lores de densidad óptica a 230 nm, por medio de una cubeta
de paso, para equilibrar la columna. En 5 ml de tampón del
gel se disolvió una ampolla de C1 IAC semipurificada y lio-
filizada (preparada como se ha descrito en la patente de Es-
5 tados Unidos número 4.132.769, columna 31, arriba menciona-
da). Después de la aplicación de esta muestra, se recogie-
ron fracciones del eluato y se efectuaron medidas de la den-
sidad óptica a 230 nm, como se ha descrito arriba. Esto dio
como resultado una curva de elución de proteína como se
10 muestra en la figura 3. Para separar el exceso de Triton
X-100, las fracciones 16 a 60 se "dializaron" individualmen-
te, por medio de columnas pequeñas de G-10 Sephadex (gel de
agarosa), que fueron calibradas previamente en 0,1% de Tri-
tón X-100 + tampón fosfato 20 milimolar ("tampón de diáli-
15 sis"), de la siguiente manera: primeramente, se cargaron
las fracciones individuales en las columnas G-10. Después,
se efectuó un lavado con entre aproximadamente 2 y 3,5 ml
de "tampón de diálisis", dependiendo del volumen de entrada.
Las muestras eluidas ("dializadas") se sometieron directa-
20 mente a un ensayo de Manzini anti C1 IAC (véase la patente
de Estados Unidos número 4.132.769), correspondiendo cada
una de las muestras dializadas a la fracción de la filtra-
ción por gel que se aplicaba a un orificio perforado en la
placa de Manzini. Al cabo de 48 horas, se determinó el diá-
25 metro del anillo de precipitación. Los resultados se repre-
sentan gráficamente en la figura 3.

Como se ve en la figura 3, hay un pico pequeño pa-
ra 90.000 a 100.000 Daltons, y un pico claro (el mayor) pa-
ra 50.000 a 55.000 Daltons, seguidos por un hombro para
25.000-30.000 Daltons. Una comparación de estos resultados

1 con el modelo de la SDS PAGE de la CaDet justifica la pre-
sunción de que la CaDet (idéntica o casi idéntica a la C1
IAC pura) muestra un peso molecular complejo o pesos molecu-
lares complejos en detergente no iónico. Los complejos de
5 C1 IAC pueden haber sido formados por las especies de
25.000 Daltons, puesto que en la filtración por gel arriba
mencionada, podían observarse especies tanto de 25.000, co-
mo de 50.000 y de 100.000 Daltons. Cuando se efectuó la mis-
ma filtración por gel, sin detergente, se observó un pico
10 ancho en el margen de 75.000 a 125.000 Daltons.

Preparación de la CaDet.

10 ml de anti C1 IAC (absorbida) cultivada en cer-
do, y preparada y absorbida como se describe en la patente
de Estados Unidos número 4.132.769, se mezclaron con 10 ml
15 de bicarbonato sódico (0,1 molar), que contenían cloruro só-
dico 0,5 molar, pH 8,3. Se suspendieron y se lavaron 2 g de
gel seco de "Sepharose 4B" activado por CNBR (agarosa reti-
culada) en ácido clorhídrico 10^{-3} molar (en total 400 ml).
Después de filtración (embudo Büchner), se mezcló el gel
20 con la solución de anticuerpo arriba mencionada, a la tempe-
ratura ambiente, y con agitación lenta durante 2 horas. Des-
pués de la copulación con el anticuerpo, se lavó el gel con
tampón de carga (acetato sódico 0,1 molar, pH 7,2) que con-
tenía un 1% de etanolamina. Se desgasificó el gel bajo va-
25 cío, y se cargó en una columna de cromatografía K9/10 Phar-
macia, y se lavó con 10 volúmenes de lecho de tampón de car-
ga y, después, con 10 volúmenes de lecho de tampón eluyente
(cloruro sódico 1 molar) + 0,1% de Triton X-100, solución de
tampón de fosfato (PBS - pH 7,2). Este ciclo de lavado se
30 efectuó 5 veces. Después, la columna estaba lista para la

1 aplicación de material que contiene proteínas reactivas con
anticuerpos contra C1 IAC. En este caso, se utilizó el mis-
mo material liofilizado que contenía C1 IAC, que se utilizó
para la filtración por gel arriba descrita. El material lio-
5 filizado se disolvió en 5 ml del tampón de carga arriba des-
crito. La columna se lavó con tampón de carga, hasta que se
hubo arrastrado por lavado la proteína no fijada a la colum-
na. Todas las fracciones arrastradas por lavado desde la co-
luna, y registradas en espectrofotómetro con cubeta de pa-
10 so, se designaron como "lavados". Después, se eluyó la co-
luna mediante el tampón de elución arriba mencionado, en
fracciones de 5 ml.

Se reunieron los eluatos y se concentraron por me-
dio de conductos de diálisis/sacarosa, hasta un volumen de
15 unos 2 ml. Esto se denomina "eluato". Se efectuó la misma
operación de concentración desde 40 ml hasta unos 2 ml, con
los "lavados" arriba mencionados. La proteína cruda que con-
tenía C1 IAC, aplicada a la columna, se determinó "entrada".
La carga, el lavado y la elución se efectuaron a 4°C.

20 La "entrada", el "lavado y el "eluato", se ensaya-
ron para determinar la presencia de fijación de proteína a
la anti C1 IAC, descrita en la patente de Estados Unidos nú-
mero 4.132.769. Esta determinación se efectuó utilizando
placas de gel de agarosa de Manzini, coladas, que contenían
25 antisuero porcino. En los orificios perforados en la placa,
de 5 microlitros, se aplicaron muestras de "entrada", "lava-
do" y "eluato". Se observó una precipitación en los tres ca-
sos, la cual tenía un aspecto similar a las precipitaciones
que se ven en la figura 2.

30

En la tabla siguiente, se relacionan los resulta-

08069

1 - dos del ensayo de Manzini:

TABLE I

Experimento nº 465	Precipitación en volumen con anti-C1 IAC	Zona de precipitación
5 entrada	3,0	positiva 10 mm
Concentra (lavado	1,0	positiva 10 mm
do de (eluato	1,0	positiva 14 mm

10 Las zonas de precipitación indicadas en la tabla anterior, son los diámetros de la precipitación, determinados mediante la técnica de Manzini (SRID).

De esto se deduce que se encontró actividad de C1 IAC en la "entrada", en el "lavado" y en el "eluato". En otro experimento (número 471), se encontró lo mismo.

15 La "entrada", el "lavado" y el "eluato" se sometieron a electroforesis SDS PAGE (longitud 15 cm, gradiente 8 a 20%, espesor 0,75 mm, seleccionado como un método adecuado). El resultado de los experimentos realizados con la "entrada", el "lavado" y el "eluato" en las condiciones anteriores, se ven en la figura 1. Se observa que del 95 al 20 99% de la fracción de proteína asociada con el cáncer, sometida a tratamiento en estas condiciones, aparece como una banda (véase figura 1, números 5 y 9, eluatos reunidos de la fracción de proteína asociada con el cáncer. Basándose en cálculos con los marcadores moleculares de 12.400, 17.800, 25 25.000 y 45.000, tal como se ve en la figura 1, número 1, número 6 y número 10, se observa que el peso molecular de la fracción de proteína asociada con el cáncer, tiene un valor de aproximadamente 25.000 en este sistema (en condiciones no reductoras, es decir, sin mercapto etanol).

Inmunización de cerdos

1 Para la inmunización de cerdos, se disuelven de 1
a 5 gammas de CaDet, con 0,1% de Triton X-100, en 1 ml de
solución salina, y se mezcla la solución con 1 ml de coadyu
vante de Freund (completo o incompleto).

5 La operación de inyectar al cerdo y la recogida
del antisuero, etc., se lleva a cabo como se describe en la
patente de Estados Unidos número 4.132.769, arriba menciona
da. Después de 3 a 5 inyecciones, con intervalos de 2 sema
nas, se observa en el cerdo un anticuerpo específico, for
mando el anticuerpo específico un precipitado bien definido
10 frente a la C1 IAC cruda y frente a la C1 IAC, preparada co
mo se describe en la patente de Estados Unidos anterior.
Sin embargo, como se comprueba por el tamaño de los anillos
de precipitación en la técnica de Manzini, el anticuerpo es
15 específico cultivado frente a CaDet, parece tener un título
que es aproximadamente 10 veces mayor que el título obteni
do cuando se inmuniza la C1 IAC, como se describe en la pa
tente de Estados Unidos número 4.132.769 arriba mencionada.
Al igual que los anticuerpos cultivados frente a C1 IAC,
20 los anticuerpos cultivados frente a la CaDet, reaccionan
por precipitación contra la proteína C1 IAC asociada con el
cáncer, preparada como se describe en la patente de Estados
Unidos número 4.132.769 arriba mencionada, y contra la CaDet
purificada mediante la técnica de elución descrita en la
25 presente memoria, así como contra los sueros y los fluidos
fisiológicos procedentes de pacientes de cáncer, utilizan
do, por ejemplo, la técnica de Manzini descrita en la paten
te de Estados Unidos número 4.132.769. Un ejemplo de una
placa de Manzini adecuada (con un aumento de unas tres ve
ces) se ve en la figura 2. Los sueros procedentes de hembras

30

08069

1 no embarazadas y en buen estado de salud (que no adolecen
de un cáncer clínicamente detectable) no muestran precipita
ción, ni frente al anticuerpo, preparado de acuerdo con la
patente de Estados Unidos número 4.132.769, ni frente al an
5 ticuerpo cultivado frente a la CaDet. Mediante la técnica
de Ouchterlony, se encuentra una identidad entre el antisue
ro anti-C1 IAC, como se describe en la patente de Estados
Unidos número 4.132.769, y la anti-CaDet.

10

Otras características de la proteína asociada con
el cáncer

15

La muestra de C1 y AC liofilizada, utilizada como
material de partida en el método de filtración por gel arri
ba descrito, se sometió a caracterización en lo que respec
ta a la sensibilidad de sus propiedades antigénicas frente al
pH. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Sensibilidad frente al pH en lo que respecta a las propieda
des antigénicas de la C1 IAC.

20

pH	Precipitación con antisuero anti-C1 IAC
2,5	ninguna
3,5	ninguna
4,0	positiva
5,5	positiva
9,5	positiva
25 10,0	ninguna

Se observará que las propiedades antigénicas se des
truyen a un pH 3,5 e inferior, y a un pH de 10,0 y superio
res.

30

Se investigó la sensibilidad de la misma prepara
ción de C1 IAC en lo que respecta a la sensibilidad de sus

08069

**POOR
QUALITY**

1 propiedades antigénicas frente a diversos productos químicos.
Los resultados se ven en la tabla siguiente:

	Productos químicos	Precipitación con anti suero anti-C1 IAC
5	3M KSCN	ninguna
	3M urea (incl. 0,4% etanolamina)	positiva
	1% SDS + 10% Berol	positiva
	5% SDS	positiva
	1% SDS + 10% Triton X-100	positiva
10	0,1% Triton X-100	positiva (anillo mayor*)
	3M KSCN (incl. 1% etanolamina)	positiva (anillo menor**)
	8M urea	positiva
15	8M urea, 2 minutos de calentamiento a 96°C	negativa
	8M urea + 0,4% mercaptoetanol	positiva
	8M urea + 0,4% mercaptoetanol, 2 minutos de calentamiento a 96°C	negativa
	0,2% SDS	positiva (anillo mayor*)
20	0,2% SDS, 2 minutos de calentamiento a 96°C	negativa
	0,2% SDS + 0,4% mercaptoetanol	positiva
	0,2% SDS + 0,4% mercaptoetanol, 2 minutos de calentamiento a 96°C	negativa
	0,2% Triton X-100	positiva
25	0,2% Triton X-100 + 0,4% mercaptoetanol, 2 minutos de calentamiento a 96°C	negativa

*) La razón de la precipitación en forma de anillo mayor, que indica mayores antigenicidades, podría ser que estos productos químicos disuelven los agregados de proteínas asociadas con el cáncer, del tipo presente.

***) A pesar de la presencia de etanolamina al 1%, las propiedades antigénicas son algo reducidas, debido a la presencia de sulfocianuro potásico 3M.

1 Se observará que las propiedades antigénicas se pierden por la influencia del sulfocianuro potásico 3M por sí solo, y que las propiedades antigénicas parecen conservarse en los otros casos. Sin embargo, el calentamiento destruye siempre las propiedades antigénicas.

5 Material alternativo para la inmunización de animales

10 En un aspecto particular de la presente invención, se ha encontrado que se puede realizar una inmunización de animales, aunque con resultados menos buenos que los resultados obtenidos con la CaDet, cuando se utiliza un material sobrenadante, preparado como se describe seguidamente: células de sarcoma osteógeno de origen humano, se cultivaron en monocapa, en MEM de Eagle, con sal de Hank y suero de ternera fetal al 5%, con glutamina añadida, como se describe en la patente de Estados Unidos número 4.132.769 arriba mencionada. Después, las células más el líquido de cultivo, se congelaron a -30°C y, seguidamente, se centrifugó la mezcla resultante, y se utilizó el material sobrenadante para inmunizar cerdos, de la misma manera que se ha descrito arriba.

15 Se cree que la congelación produce como resultado la citólisis o destrucción de las células, para liberar las proteínas, incluido un antígeno.

20 Es de señalar que este material sobrenadante, después de mezclarlo con coadyuvante de Freund, podría ser utilizado directamente para inmunizar cerdos. En esta inmunización, los cerdos producen un anticuerpo específicamente reactivo con la CaDet y con la C1 IAC, y con los sueros de cáncer humano o con los fluidos fisiológicos procedentes de pacientes de cáncer. Después de someter las células cancerosas humanas a las técnicas arriba descritas de cultivo y de

congelación, se puede efectuar cualquier purificación deseada de las mismas, por ejemplo, utilizando el método descrito arriba para la preparación de la CaDet a partir de un material crudo que contiene Cl IAC.

5 De acuerdo con los principios descritos en la patente de Estados Unidos número 4.132.769, los anticuerpos cultivados frente a Cl IAC pueden ser sometidos a modificación o fragmentación, de manera que se obtengan fragmentos o modificaciones de los mismos, con diversas finalidades,
10 de una manera muy semejante a la descrita en la patente de Estados Unidos.

Para una mejor comprensión de los dibujos reglamentarios hay que señalar que:

15 En la Figura 1. Los números situados encima de la raya se refieren a los μ g cargados. El significado de los números situados debajo de la raya es : 1 = marcadores ; 2 = Cl IAC bruto; 3 = "Lavado" Nº 465 ; 4 = - ; 5 = Eluato nº 465 reunido ; 6 = Marcadores ; 7 = "Lavado" nº 471 ; 8 = - ; 9 = Eluato nº 471 reunido ; 10 = marcadores.

20 En la Figura 2. 1 = gel de agarosa ; 2 = Agujero perforado y 3 = anillo de precipitación.

25 En la Figura 3. A = Proteínas ; B = Ensayo de Manzini; Eje vertical izquierdo = Log Mv ; Eje vertical derecho = Ensayo de Manzini, en mm.; Eje horizontal = Nº de las fracciones.

REIVINDICACIONES

5 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:

10 1ª.- Un método para producir antisueros o anticuerpos contra una glicoproteína asociada con el cáncer que presenta actividad inactivadora de Cl (actividad inhibidora de la esterasa Cl), método que comprende inmunizar un animal no humano, específicamente inmunizable, con una proteína (CaDet) que precipita con inmunoglobulinas dirigidas específicamente contra dicho inactivador de Cl asociado con el cáncer y que en un gel de gradiente de acrilamida SDS PAGE muestra esencialmente solo una banda bien definida a 25.000 Daltons, y recoger suero procedente del animal inmunizado.

20 2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que la proteína CaDet se combina con un material inmunogénico.

 3ª.- Un método según las reivindicaciones 1ª y 2ª, en el que el animal inmunizado es un cerdo.

25 4ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en el que se aíslan inmunoglobulinas IgG de cerdo sustancialmente puras del suero recogido del cerdo.

 5ª.- Un método para producir antisueros o anticuerpos contra una glicoproteína asociada con el cáncer.

30 Tal y como se ha descrito en la memoria que an-

tecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

Esta memoria consta de veinticuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 01.FEB.1980

P.A.

Fernando de Elzaburu
Por Poder.

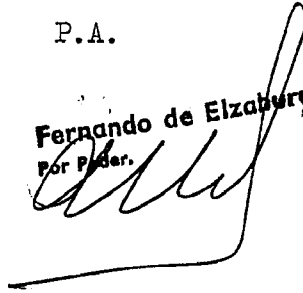
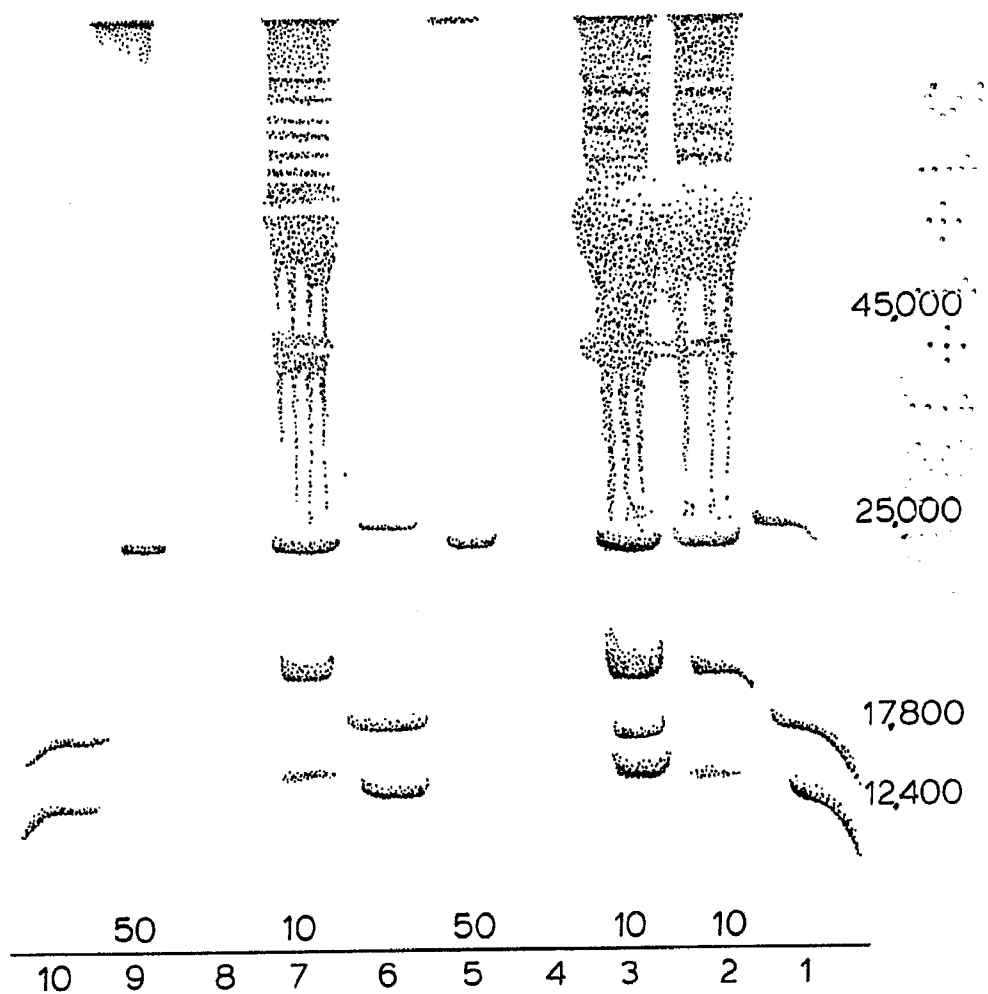


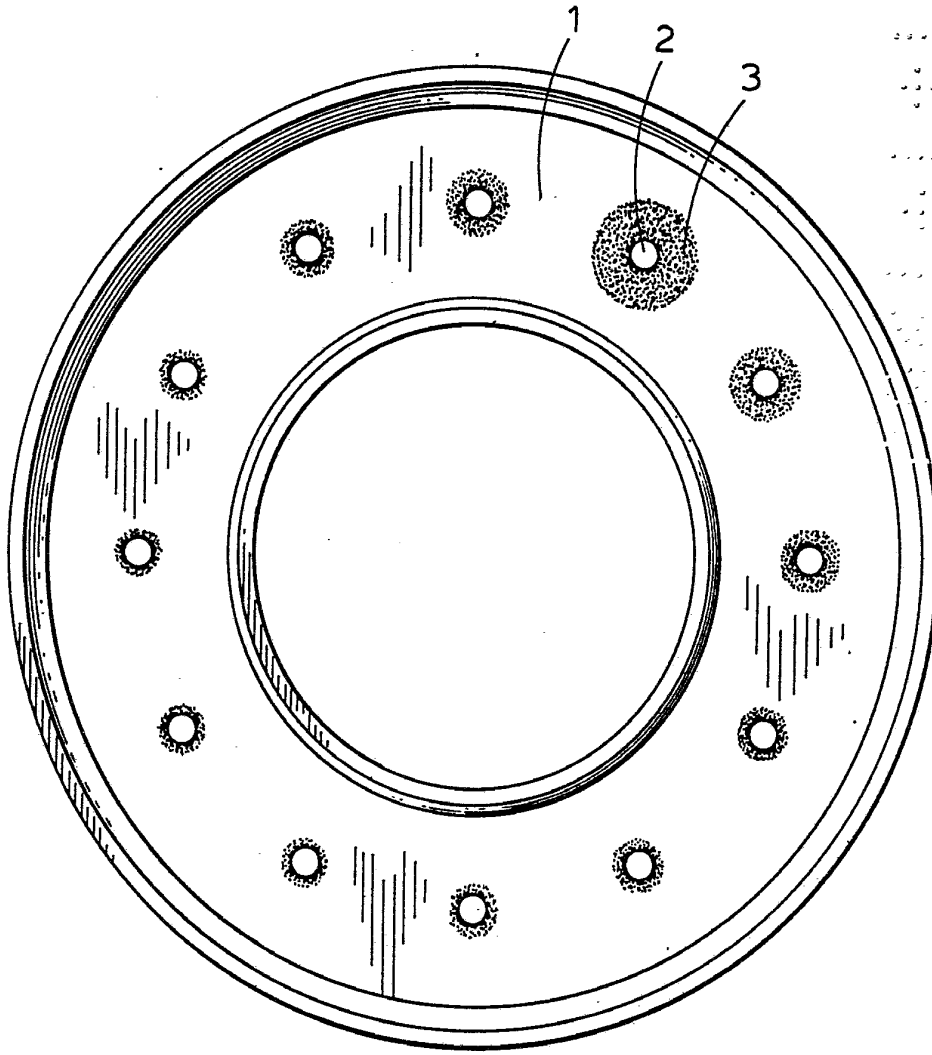
Fig.1



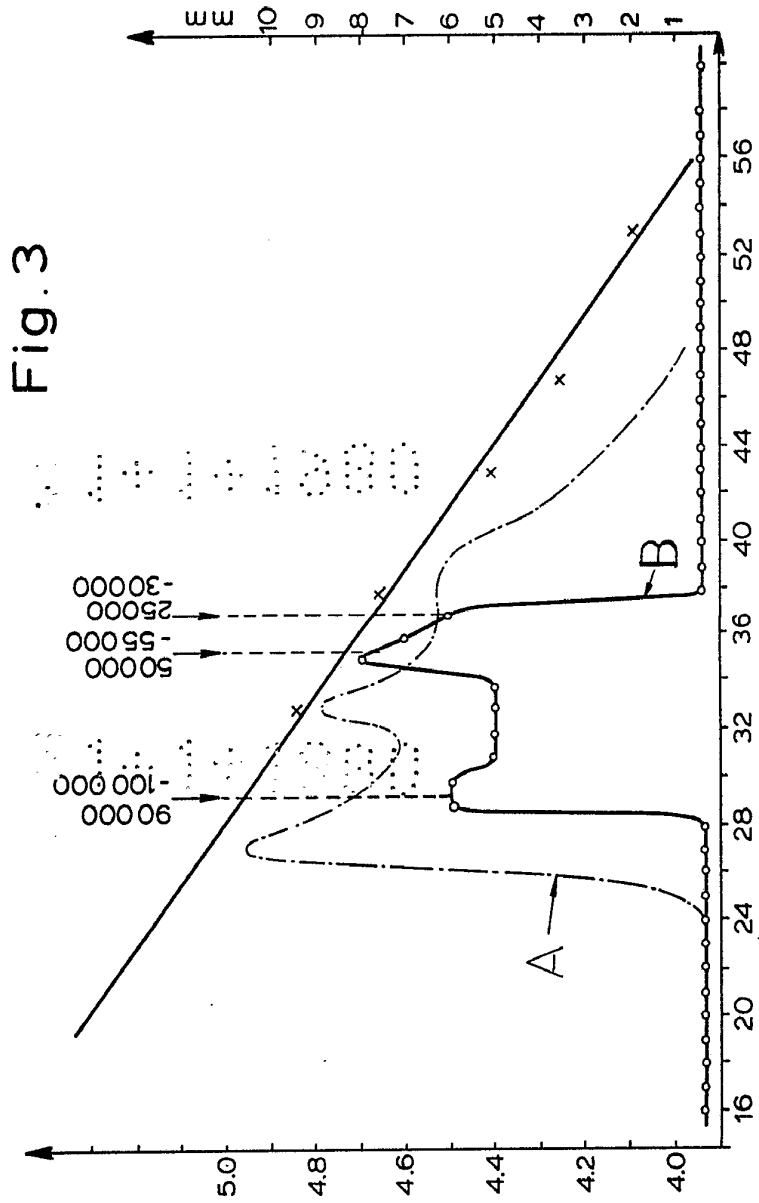
Fernando de Elizaburo
Por Poderes

P71989

Fig. 2



Fernando de Elizaburu
Per Poder.



4 1 9 8 8

4 1 9 8 8

Handwritten signature

A/S ALFRED BENZON

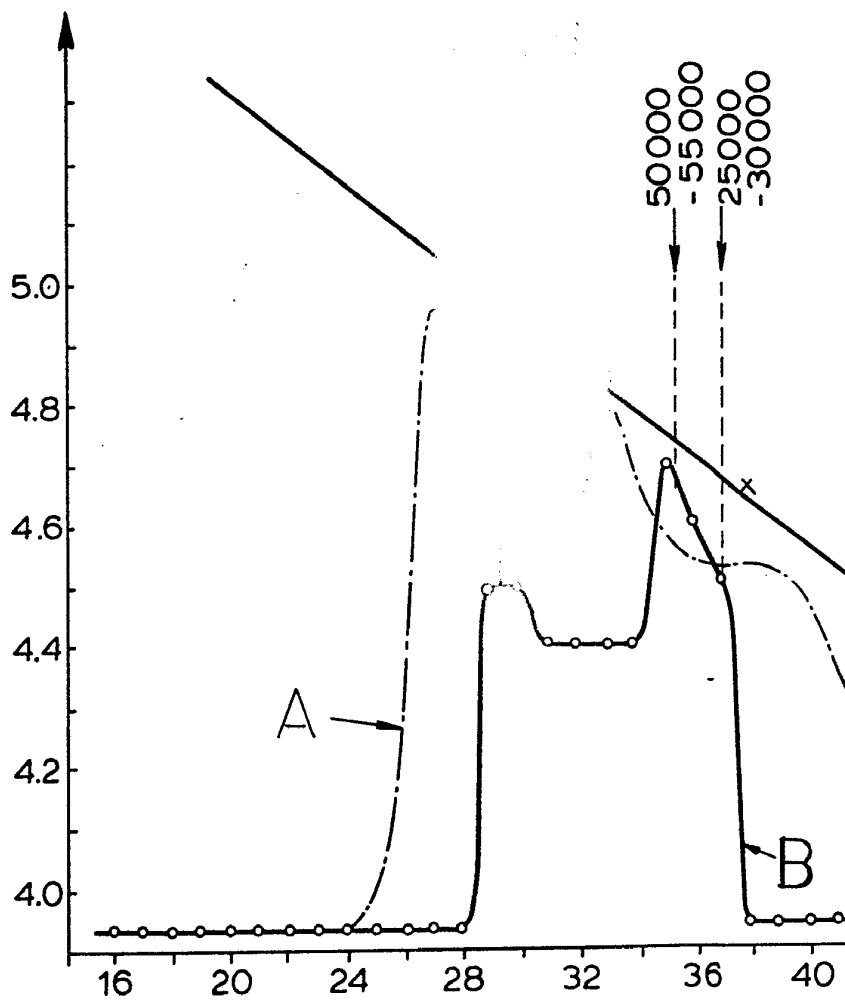
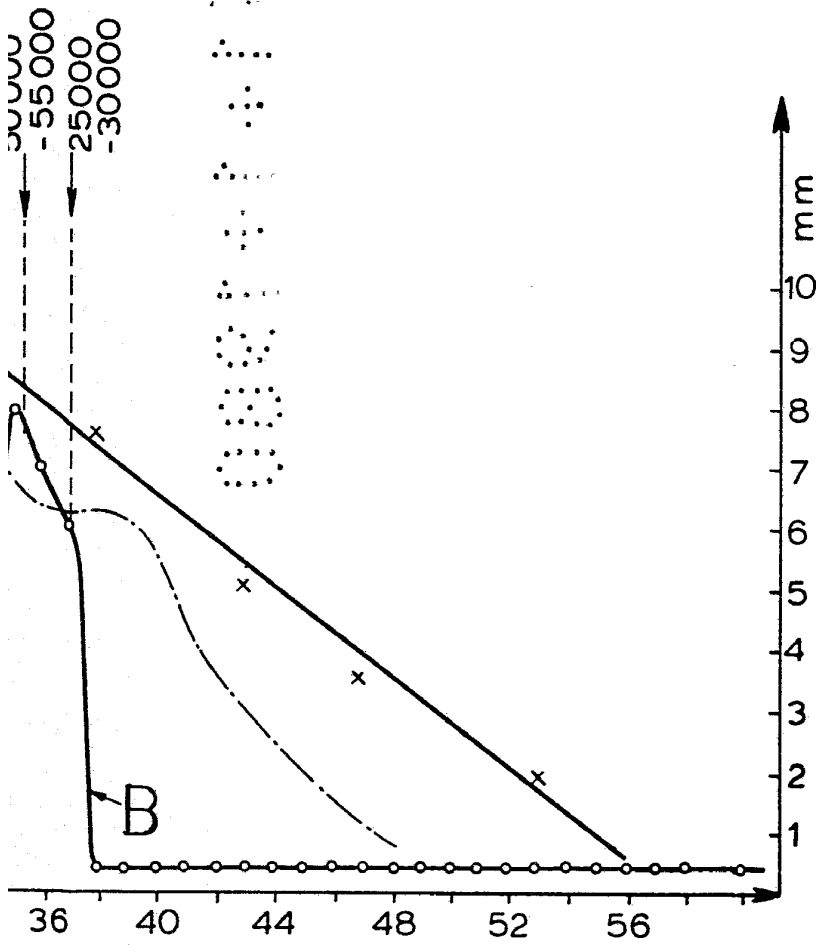


Fig. 3



[Handwritten signature]
FEDERATION DE...
Les Potes.