

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **78100134.2**

(51) Int. Cl.²: **C 07 G 7/00//G 01 N 33/10**

(22) Anmeldetag: **09.06.78**

(30) Priorität: **15.06.77 DE 2726886**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
10.01.79 Patentblatt 79/1

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE FR GB LU NL SE

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft,**
Postfach 1140,
D-3550 Marburg/Lahn (DE)

(72) Erfinder: **Bohn, Hans, Dr.,**
Oberer Eichweg 26,
D-3550 Marburg/Lahn (DE)

(72) Erfinder: **Winckler, Wilhelm,**
Am Hang 23,
D-3551 Wenkbach (DE)

(74) Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr. et al,**
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20,
D-6230 Frankfurt/Main 80 (DE)

(54) **Neues Glykoprotein und Verfahren zu dessen Herstellung und seine Verwendung zur Gewinnung von Antiseren.**

(57) Gegenstand der Erfindung ist ein neues Glykoprotein, welches aus Blutserum, aus Urin und dem Extrakt menschlicher Plazenten erhältlich ist. Es ist gekennzeichnet durch einen Proteinanteil, im wesentlichen bestehend aus α -Aminosäuren, von $75 \pm 6\%$, einen Kohlenhydratanteil, von $24,6 \pm 5,2\%$, davon Hexosen $8,9 \pm 2\%$, N-acetyliertes Hexosamin $7,1 \pm 1,5\%$, Fucose $0,2 \pm 0,2\%$, N-acetylierte Neuraminsäure $8,4 \pm 1,5\%$, einen Sedimentationskoeffizienten s_{20w} von $2,5 \pm 0,3$ S, ein Molekulargewicht von $35\,000 \pm 5\,000$ aufgrund der Bestimmung in der Ultrazentrifuge bzw. ein Molekulargewicht von $65\,000 \pm 10\,000$ aufgrund der Bestimmung im Natriumdodezylsulfat-haltigen Polyacrylamidgel, einen isoelektrischen Punkt von $pH\ 3,4 \pm 0,4$, einen Extinktionskoeffizienten $E_{1\%}^{1cm}$ (280 nm) von $1,9 \pm 0,3$, eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich zwischen den α_1 - und den α_2 -Globulinen und eine spezifische immunologische Reaktion mit einem spezifisch gegen das Glykoprotein gerichteten Antikörper.

Man gewinnt das Glykoprotein, indem man Körperflüssigkeiten oder Extrakte von Organen, welche das Glykoprotein enthalten, fraktioniert.

Zur Gewinnung von Antiseren werden Wirbeltieren mit dem Glykoprotein immunisiert.

EP 0 000 134 A1

- 1 -

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT. HOE 77/B 012 Dr. LI

Neues Glykoprotein und Verfahren zu dessen Herstellung
und seine Verwendung zur Gewinnung von Antiseren

Die Erfindung betrifft ein neues Glykoprotein, das im Blutserum, im Urin und im Extrakt menschlicher Plazenten nachgewiesen und daraus isoliert werden kann sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

5

Die durch die wässrige Extraktion menschlicher Plazenten erhältliche Proteinlösung enthält bekanntlich eine Vielzahl von Komponenten, die teilweise den Serumproteinen zuzuordnen und zum anderen Teil Gewebeproteine sind.

10

Die Erfindung hat sich die Aufgabe gestellt, ein bisher noch nicht bekanntes Serum-Glykoprotein aus dem Extrakt menschlicher Plazenten zu isolieren, damit spezifisch gegen das neue Glykoprotein gerichtete Antiseren herzustellen, womit das Glykoprotein im Serum und im Urin qualitativ nachgewiesen oder quantitativ bestimmt werden kann.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues Glykoprotein, welches aus Blutserum, aus Urin und dem Extrakt menschlicher Plazenten erhältlich ist. Es ist gekennzeichnet durch

20

BAD ORIGINAL



einen Proteinanteil, im wesentlichen bestehend aus α -Aminosäuren von $75 \pm 6 \%$,
 einen Kohlenhydratanteil von $24,6 \pm 5,2 \%$, davon Hexosen $8,9 \pm 2 \%$, N-acetyliertes Hexosamin $7,1 \pm 1,5 \%$, Fucose
 5 $0,2 \pm 0,2 \%$, N-acetylierte Neuraminsäure $8,4 \pm 1,5 \%$,
 einen Sedimentationskoeffizienten s_{20w} von $2,5 \pm 0,3 S$,
 ein Molekulargewicht von $35\ 000 \pm 5\ 000$ aufgrund der Bestimmung in der Ultrazentrifuge bzw. ein Molekulargewicht von $65\ 000 \pm 10\ 000$ aufgrund der Bestimmung im
 10 Natriumdodezylsulfat-haltigen Polyacrylamidgel,
 einen isoelektrischen Punkt von $pH\ 3,4 \pm 0,4$,
 einen Extinktionskoeffizienten $E_{1\ cm}^{1\ \%}$ (280 nm) von $1,9 \pm 0,3$, eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich zwischen den α_1 - und den α_2 -Globulinen und
 15 eine spezifische immunologische Reaktion mit einem spezifisch gegen das Glykoprotein gerichteten Antikörper.

Zur Erläuterung der kennzeichnenden Merkmale des Glykoproteins sei folgendes ausgeführt:

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten wurde in einer analytischen Ultrazentrifuge der Firma Beckman (Spinco-Apparatur, Modell E) bei 6.000 UpM in Doppel-
 25 sektorzellen mit Hilfe der UV-Scanner Technik bei 280 nm durchgeführt. Als Lösungsmittel diente ein 0,05 M Phosphatpuffer (pH 6,8) der 0,2 Mol/l NaCl enthielt. Die Proteinkonzentration betrug 2 %. Die Sedimentationskoeffizienten sind auf die Basis von Wasser bei 20°C umgerechnet worden.

30 Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurde die Sedimentationsgleichgewichtsmethode und die Polyacrylamidgel-Elektrophorese herangezogen. Die Bestimmung in der Ultrazentrifuge wurde bei 9.000 UpM vorgenommen. Die Auswertung
 35 erfolgte unter Zugrundelegung eines partiellen spezifischen Volumens (partial specific volume) von 0,74 mg/g. In der

Ultrazentrifuge ergab sich ein Molekulargewicht von 35.000 ± 5.000 .

Für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden zwei Verfahren angewandt. Die Auftrennung im normalen Polyacrylamid (PAA)-Gel erfolgte nach der Methode von Zwisler und Biel, Z.klin. Chem. 4, Seite 58, (1966). Zur Untersuchung im Natriumdodecylsulfat-haltigen Gel wurde ein Gel mit 7,5 % PAA das 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) enthielt, verwendet. Zur Reduktion sind die Proteine in 1 % SDS mit 1 % Merkaptoäthanol inkubiert worden. Das Anfärben der Proteine geschah mit Amidoschwarz. Aus der Wanderung im SDS-haltigen PAA-Gel wurde für das Glykoprotein ein Molekulargewicht von 65.000 ± 10.000 abgeleitet.

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde mit einer Säule (440 ml) der Firma LKB Stockholm, durchgeführt. Das sogenannte Ampholin-Gemisch hatte bei der Untersuchung des Glykoproteins einen pH-Bereich von 2,5 bis 4,0.

Die Untersuchung der elektrophoretischen Beweglichkeit erfolgte in der Mikromodifikation von Beckmann Instruments auf Zelluloseazetatfolien mit Natriumdiäthylbarbiturat-Puffer pH 8,6.

Die Bestimmung der Kohlehydrate erfolgte nach der von H.E. Schultze, R. Schmidtberger, H. Haupt, Biochem. Z. 329, Seite 490, (1958), beschriebenen Methode.

Die Aminosäurenanalyse wurde nach S. Moore, D.H. Spackmann, W.H. Stein, Anal. Chem. 30, Seite 1185, (1958), unter Verwendung des Flüssigkeitschromatographen Multichrom B der Firma Beckmann durchgeführt. 1/2 Cystin wurde nach Oxydation der Proteine mit Perameisensäure (S. Moore et al., Anal. Chem. 30, Seite 1185, (1958)) und nachfolgender Chromatographie (S. Moore, J.Biol.Chem. 238, Seite 235, (1963)) als Cysteinsäure bestimmt. Der Tryptophangehalt ist mit

der direkten photometrischen Bestimmung nach H. Edelhoch, Biochemistry 6, Seite 1948, (1967) ermittelt worden.

Die immunologische Charakterisierung der Substanz erfolgt
5 am einfachsten mit einem bekannten Diffusionsverfahren, bei welchen Antigen, d.h. das Glykoprotein und ein gegen das Glykoprotein gerichteter Antikörper bzw. das hinsichtlich der Antikörper nicht angereicherte Antiserum gegeneinander in einem Trägermedium, wie z.B. Agar, diffundieren.
10 Treffen die beiden Reaktionskomponenten in einem günstigen Verhältnis aufeinander, bildet sich ein sichtbares Präzipitat aus. Nach dieser Kenntnis ist es für den Fachmann einleuchtend, daß alle immunologischen Techniken zum Nachweis und zur Bestimmung sowohl des neuen Glykoproteins,
15 als auch der gegen das Glykoprotein gerichtete Antikörper möglich sind.

Eine einfache und in der Regel ausreichend genaue Methode zur quantitativen Bestimmung des Glykoproteins in Körperflüssigkeiten oder in Gewebeextrakten stellt die sogenannte Laurell-Technik dar. Sie ist beschrieben in Analyt. Biochem. (New York), 15, Seite 45 (1966).

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung des oben charakterisierten Glykoproteins, dadurch gekennzeichnet, daß Körperflüssigkeiten oder Extrakte von Organen, welche das Glykoprotein enthalten, unter Zugrundelegung folgender erfindungsgemäß gefundener Kriterien fraktioniert werden.

30

Das Glykoprotein ist mit Neutralsalzen fällbar. Mit dem üblicherweise für derartige Fällungen verwendeten Ammoniumsulfat wird es bei einer Sättigungskonzentration des Salzes von 30 bis 60 % in einem pH-Bereich in der Nähe des Neutralpunktes gefällt.
35

Entsprechend seinem Molekulargewicht kann das Glykoprotein durch Membranen, die zur Abtrennung von Substanzen mit

Molekulargewichten zwischen 25.000 und 75.000 geeignet sind, gewonnen werden. Vorteilhaft werden hierfür die Methoden der Gel-Filtration oder Ultrafiltration eingesetzt.

5

Das Glykoprotein wird bei neutralem oder schwach alkalischem pH-Wert an schwach basische Ionenaustauscher adsorbiert. Vorteilhaft wird dabei eine vergleichsweise wenig konzentrierte Pufferlösung verwendet, denn durch
10 Erhöhung der Salzkonzentration oder auch durch Erniedrigung des pH-Wertes kann die Adsorption verhindert werden. Andererseits bietet sich bei Kenntnis dieses Verhaltens die Möglichkeit an, das Glykoprotein zu adsorbieren und unter Verwendung von höherkonzentrierten Salzlösungen
15 bzw. von Pufferlösungen mit erniedrigtem pH-Wert zu eluieren.

Es hat sich gezeigt, daß das neue Glykoprotein mit den wasserlöslichen organischen Basen der Acridin- und
20 Chinolinreihe, die für Protein-Fällungsverfahren üblicherweise Verwendung finden, nicht präzipitiert wird. Es bleibt in den bei diesem Verfahren üblichen Konzentrationen im wässrigen Überstand. Danach kann eine Acridinbase, wie 2-Äthoxy-6,9-Diaminoacridinlactat oder eine
25 Chinolinbase, wie Bis-(2-methyl-4-aminochinolyl-6)-carbamid-hydrochlorid, zur Fällung von begleitenden Proteinen verwendet werden, wobei das erfindungsgemäße Glykoprotein im Überstand verbleibt.

Ähnliche Überlegungen können gelten bei Verwendung von Hydroxylapatit als Adsorbens für Proteine. Das neue Glykoprotein zeigt keine Affinität zum Hydroxylapatit, wohingegen eine Reihe von Begleitproteinen von Hydroxylapatit festgehalten wird. Das Glykoprotein gehört somit zu den
35 Hydroxylapatit-passierenden Globulinen. Der Erfinder schlägt vor, es als Hydroxylapatit passierendes Globulin (HPG-2) zu bezeichnen.

Aufgrund der Kenntnis der elektrophoretischen Beweglichkeit kann für die Anreicherung bzw. Isolierung des Glykoproteins die präparative Zonenelektrophorese eingesetzt werden.

5

Die Affinität des Glykoproteins aufgrund seines immunologischen Verhaltens kann dafür eingesetzt werden, das Glykoprotein mit Hilfe von sog. Immun-Adsorptionsverfahren anzureichern. Hierfür kann in ansich bekannter Weise ein
10 Immunadsorbens d.h. ein trägergebundener Antikörper, gegen das neue Glykoprotein hergestellt werden, welches das Glykoprotein spezifisch zu binden vermag. Das Glykoprotein kann danach durch Änderung der Milieubedingungen wieder eluiert werden, wie dies in der Fachliteratur mehrfach
15 beschrieben ist.

Durch eine ausgewählte Kombination der genannten Methoden, die einerseits zur Anreicherung des Glykoproteins andererseits zu einer Abtrennung von übrigen Begleitproteinen
20 führen, kann die Isolierung der erfindungsgemäßen Substanzen erfolgen. Demzufolge ist der Gegenstand der vorliegenden Erfindung in den einzelnen Anreicherungsschritten für das neue Glykoprotein und in den durch Kombination der Maßnahmen zur Anreicherung sich ergebenden Verfahren
25 zu dessen Reinigung zu sehen.

Die Leitlinie für das Verfahren zur Herstellung des Glykoproteins besteht darin, daß jeweils derjenige Anteil gewonnen wird, welcher eine positive immunologische Reaktion mit einem gegen das neue Glykoprotein gerichteten
30 Antiserum ergibt.

Nach Durchführung der genannten Verfahrensschritte zeigt es sich zuweilen, daß das Glykoprotein noch von anderen immunologisch nachweisbaren Begleitproteinen verunreinigt
35 ist. In diesem Falle werden die Verunreinigungen durch deren spezifische Adsorption entfernt. Man bedient sich

dabei gängiger Techniken der Immunadsorption, bei welchen nach beschriebenen Verfahren an einen Träger gebundene Antikörper gegen das zu entfernende Protein als Adsorbentien eingesetzt werden. Häufig ist das weitgehend
5 reine neue Glykoprotein noch mit Spuren des schwangerschafts-spezifischen β_1 -Glykoproteins und/oder des α_1 -Glykoproteins, auch als leicht fällbares α_1 -Glykoprotein bezeichnet, vergesellschaftet. Zu deren Abtrennung können gegen die Proteine gerichteten Immunglobuline, welche
10 kovalent an vernetzte Agarpräparationen, wie z.B. SEPHAROSE, gebunden sind, verwendet werden.

Die auf eine Säule, welche mit dem spezifischen Immunadsorbens gefüllt wurde, aufgetragene Proteinlösung läuft
15 insoweit unbehelligt durch die Säule, als nur diejenigen Komponenten gebunden werden, gegen die der Träger einen immunologisch aktiven Partner enthält. Das neue Glykoprotein kann auf diese Weise von den Verunreinigungen befreit werden.

20 Zur Herstellung des neuen Glykoproteins werden mehrere der angeführten Maßnahmen miteinander kombiniert und dabei jeweils diejenige Fraktion weiterverarbeitet, in der immunologisch das neue Glykoprotein nachgewiesen werden
25 kann, während die übrigen Fraktionen verworfen werden.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung des neuen Glykoproteins kann jede Körperflüssigkeit oder jeder Organextrakt verwendet werden, in welchem es gelingt, das
30 Glykoprotein immunologisch nachzuweisen. Bevorzugt werden Extrakte menschlicher Plazenten verwendet, die durch Zerkleinerung und Extraktion mit Wasser oder einer verdünnten, zweckmäßig einer weniger als 10 %igen Salzlösung, vorteilhaft mit einer 0,5 %igen Neutralsalzlösung, wie
35 beispielsweise Natriumchlorid, gewonnen werden können. Zweckmäßig verwendet man auf 1 kg Plazenten etwa 1 - 5 Liter der Extraktionslösung. Die nicht gelösten Anteile

werden durch Zentrifugation oder Filtration von dem Extrakt abgetrennt.

Das Verfahren zur Anreicherung ist gekennzeichnet durch die Anwendung mindestens einer der folgenden Maßnahmen auf Körperflüssigkeiten, welche das neue Glykoprotein enthalten und die anschließende Gewinnung der bezüglich des Glykoproteins angereicherten Fraktion:

- 10 a) Zugabe von wasserlöslichen Derivaten einer Acridin- oder Chinolinbase, vorzugsweise des 2-Äthoxy-6,9-Diaminoacridin-lactat, im pH-Bereich von 5 - 10, vorzugsweise bei etwa pH 8, bis zu einer Endkonzentration von etwa 0,8 % (Gewicht zu Volumen), wobei das
15 Glykoprotein im wesentlichen im Überstand verbleibt.
- b) Zugabe von Neutralsalzen bis zur Ausfällung des Glykoproteins, vorzugsweise vom Ammoniumsulfat bei etwa neutralem pH-Wert von 5 - 8 bis zu 30 - 60 % der
20 Sättigungskonzentration des Ammoniumsulfats.
- c) Adsorption des Glykoproteins an einem schwach-basischem Ionenaustauscher, wie Diäthylaminoäthyl-cellulose, bei einer Leitfähigkeit der Lösung von 0 - 2 mS und neutralem oder schwachalkalischem pH-Wert (6 - 9). Beispielsweise unter Verwendung eines etwa 0,01 M Puffers vom pH-Wert von etwa 8. Ein bevorzugt zu verwendender Puffer ist beispielsweise Tris-Hydroxymethylaminomethan-HCl. Die Elution des Glykoproteins
25 kann durch Senkung des pH-Wertes unter pH 7,0 oder durch Erhöhung der Leitfähigkeit über 5 mS erreicht werden.
- d) Trennung aufgrund der Molekülgröße (Molekularsiebfraktionierung). Besonders geeignet ist die Gelfiltration
35 in einer Säule gefüllt mit einem Polymeren entsprechender Porengröße, beispielsweise mit Epichlorhydrin-vernetztem Dextran, als SEPHADEX^(R) hergestellt von der

Firma Pharmacia, Uppsala, mit dem Ziel der Anreicherung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 50.000. Aber auch Produkte wie ULTROGEL^(R) von LKB, Bromma oder BIO-GEL^(R) von Bio-Rad Laboratories,
5 Richmond, Calif. können eingesetzt werden.

e) Durchführung einer Adsorption mit Hydroxylapatit. Da das Glykoprotein in verdünnter Phosphatpufferlösung von Hydroxylapatit nicht gebunden wird, ist Hydroxyl-
10 apatit ein geeignetes Agens, um Begleitproteine des Glykoproteins aus der Lösung zu entfernen. Die Proteinlösung wird hierfür zweckmäßig auf einen pH-Wert um den Neutralpunkt eingestellt und die Leitfähigkeit der Lösung auf etwa 1 mS gehalten.

15

f) Präparative Zonenelektrophorese.

Geeignet für die Durchführung einer Elektrophorese ist eine das Glykoprotein enthaltende Lösung, vorzugsweise eine alkalische Pufferlösung, beispielsweise in einem
20 Natriumdiäthylbarbituratpuffer von pH 8,6, und einer Ionenstärke = 0,1. Die Lösung wird in eine Apparatur zur präparativen Elektrophorese eingetragen, wie sie beispielsweise von N. Heimburger und R. Schmidtberger in Behringwerke-Mitteilungen, Heft 43, Seite 83 ff.,
25 insbesondere auf Seite 119-120, beschrieben wird. Bei dem Gerät handelt es sich um die horizontale Anordnung einer Trägerelektrophorese in einem offenen Trog, in welchem das Trägermaterial zur Abführung der bei der Elektrophorese auftretenden Joul'schen Wärme auf unter
30 10°C gekühlt wird. Als Trägermaterial dienen gegenüber Proteinen indifferente Substanzen, vorteilhaft Polyvinylchlorid, oder dessen Copolymerisate in Form eines Granulats.

35 Es ist empfehlenswert, die Elektrophorese im alkalischen pH-Bereich, vorteilhaft bei etwa pH 8,6, bei einer Ionenstärke von 0,08 - 0,12 und bei einer Feldstärke

4 - 6 Volt/cm vorzunehmen. Bei Verwendung von 0,1 M Natriumdiäthylbarbituratpuffer vom pH-Wert 8,6 wandert das Glykoprotein im elektrischen Feld in den zwischen α_1 - und α_2 -Globulinen liegenden Bereich der Plasma-
5 proteine.

Für die Gewinnung des neuen Glykoproteins wird die betreffende Zone herausgeschnitten und vom inerten Trägermaterial mit Hilfe von Wasser oder wässriger Salzlösungen, beispielsweise einer 0,5 bis 1 %igen Kochsalzlösung, eluiert.
10

Das erfindungsgemäß hergestellte Glykoprotein hat antigene Eigenschaften. Eine damit durchgeführte Immunisierung
15 von Tieren nach bekannten Methoden führte zur Bildung von spezifischen Antikörpern im Blut der immunisierten Tiere. Deren Seren könne nach üblichen Verfahren gewonnen und die darin enthaltenen Antikörper angereichert werden. Die Antiseren können in bekannten immunologischen
20 Verfahren zum Nachweis und zur Bestimmung des neuen Proteins in Körperflüssigkeiten, insbesondere in dem Blutserum, Verwendung finden.

25 Die Erfindung wird in dem nachstehenden Beispiel näher erläutert.



Beispiel

150 kg tiefgefrorene Plazenten werden zerkleinert und mit
150 l einer 0,5 %igen wässrigen Natriumchloridlösung
5 extrahiert. Der Extrakt wird mit 2n-Natriumhydroxyd auf
pH 8 eingestellt und mit 50 l einer 3 %igen wässrigen
Lösung von Diaminoäthoxyacridin-lactat versetzt. Nach
einer Wartezeit von 1 Stunde wird der Überstand der das
erfindungsgemäße Glykoprotein (HPG-2) enthält, abgehebert,
10 mit 5 % festem Natriumchlorid (11 kg) zur Abscheidung des
noch in Lösung verbliebenen Diaminoäthoxyacridin-lactats
versetzt, filtriert und mit 30 % - bezogen auf das Ge-
wicht der Flüssigkeit - festem Ammoniumsulfat versetzt
und gut durchgerührt. Nach 1 Stunde wird der Niederschlag
15 abfiltriert.

500 g des auf dem Filter gesammelten Niederschlages wer-
den in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und gegen eine
0,01 molare Tris-(oxymethyl)-aminomethan-Salzsäure-Puf-
20 ferlösung vom pH-Wert 7,0, die 0,05 % Natriumazid ent-
hält, dialysiert. Die dialysierte Lösung wird zentrifu-
giert und der Überstand wird mit der gleichen Puffer-
Lösung auf 2.000 ml aufgefüllt, mit 0,1 n Natriumhydroxyd-
lösung auf pH 8,0 eingestellt und mit 500 g feuchter
25 Diäthylaminoäthylcellulose (Firma Serva, Heidelberg)
1 Stunde verrührt.

Dann wird die Diäthylaminoäthylcellulose durch Filtrieren
von der Lösung abgetrennt, zweimal mit je 1 Liter 0,01
30 molarem Tris-(oxymethyl)-aminomethan-Salzsäure-Puffer
vom pH-Wert 8,0 gewaschen und danach dreimal mit je
500 ml 0,02 molarem Tris-(oxymethyl)-aminomethan-Salz-
säure-Puffer, pH 6,5, der 0,85 % Natriumchlorid und
0,05 % Natriumazid enthält, eluiert.

35

Den vereinigten Eluaten werden 30 % Ammonsulfat, bezogen
auf das Flüssigkeitsgewicht, zugesetzt und das ganze wird

vern. rt. Der Niederschlag, der das Protein (HPG-2) enthält, wird in 300 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Proteinlösung wird gegen Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan-Salzsäure-Puffer von pH 8,0, der 1,0 Mol Natriumchlorid/l enthält, dialysiert und auf eine mit Sephadex G-150 gefüllte Säule (100 x 20 cm) aufgetragen und mit dem genannten Puffer eluiert. Während der Elution findet eine Fraktionierung der Proteine nach deren Molekülgröße statt.

10 Anschließend werden die Eluate mit spezifischem Antiserum getestet, die das Glykoprotein (HPG-2) einhaltenden Fraktionen werden gesammelt und daraus die Proteine nochmals, wie oben beschrieben, mit 30 % festem Ammonsulfat ausgefällt.

15 Zur Weiterreinigung wird die Fällung in 50 ml Wasser gelöst, gegen einen 0,005 m Phosphatpuffer, pH 6,8, dialysiert und auf eine mit Hydroxylapatit gefüllte Säule, 3 x 23 cm, gegeben. Die Entwicklung der Säule erfolgt
20 mit dem 0,005 m Phosphatpuffer, pH 6,8.

Das Glykoprotein (HPG-2) erscheint im Durchlauf; dieser wird auf einem Ultrafilter eingeeengt. Das Konzentrat wird anschließend gegen einen 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, dialysiert und an DEAE-SEPHADEX (Säule 3 x 23 cm) adsorbiert. Zur Elution und Auftrennung der adsorbierten Proteine dient ein NaCl-Gradient von 0 - 2 %. Die das Glykoprotein (HPG-2) enthaltenden Eluatfraktionen werden gesammelt eingeeengt.

30 Zur Weiterreinigung wird das eingeeengte Eluat in einer 0,075 m Ammoniumbikarbonatlösung aufgenommen und einer präparativen Zonenelektrophorese unterworfen. Die das HPG-2 enthaltende Zone wird nach der Auftrennung herausgeschnitten und mit physiologischer Kochsalzlösung eluiert;
35 die Eluate engt man anschließend auf dem Ultrafilter ein.

Das als Verunreinigung noch vorhandene α_1 B-Glykoprotein wird mit Hilfe eines entsprechenden Immunadsorbens entfernt. Zur Herstellung des Immunadsorbens werden Antikörper gegen das α_1 B-Glykoprotein kovalent an Sepharose
 5 gebunden und das so erhaltene Adsorbens mit dem Eluat im Batch-Verfahren oder in einer Säule in Berührung gebracht. Dabei wird das α_1 B-Glykoprotein an die trägergebundenen Antikörper adsorbiert, während das Glykoprotein HPG-2 in Lösung bleibt. Die Lösung, die dann nur noch HPG-2 ent-
 10 hält wird gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Man erhält etwa 10 bis 30 mg des neuen Glykoproteins HPG-2.

Es zeigt folgende Aminosäure-Zusammensetzung (Häufigkeit mit Variationskoeffizienten (VK in %):

	Häufigkeit in Mol %	VK %
Lysin	4,41	6,92
Histidin	1,22	22,79
20 Arginin	1,34	9,18
Asparaginsäure	8,23	2,56
Threonin	6,74	2,42
Serin	5,26	6,85
Glutaminsäure	12,59	0,49
25 Prolin	11,27	9,20
Glycin	5,63	9,84
Alanin	15,05	6,35
Cystin/2	3,65	22,76
Valin	9,89	7,94
30 Methionin	0,0	0,0
Isoleucin	0,88	7,39
Leucin	9,09	3,74
Tyrosin	1,02	30,77
Phenylalanin	3,60	5,14
35 Tryptophan	0,14	96,98

Patentansprüche

1. Neues Glykoprotein gekennzeichnet durch

- a) einen Proteinanteil von $75 \pm 6 \%$;
- b) einen Kohlenhydratanteil von $24,6 \pm 5,2 \%$ davon
5 Hexosen $8,9 \pm 2 \%$, N-acetyliertes Hexosamin
 $7,1 \pm 1,5 \%$, Fucose $0,2 \pm 0,2 \%$, N-acetylierte
Neuraminsäure $8,4 \pm 1,5 \%$.
- c) einen Sedimentationskoeffizienten $S_{20\text{ w}}$ von $2,5 \pm 0,3 \text{ S}$;
- d) ein in der Ultrazentrifuge bestimmtes Molekularge-
10 wicht von $35\,000 \pm 5\,000$;
- e) einen isoelektrischen Punkt von $\text{pH } 3,4 \pm 0,4$;
- f) einen Extinktionskoeffizienten $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (280 nm) von
 $1,9 \pm 0,3$;
- g) eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich
15 zwischen α_1 - und den α_2 -Globulinen;
- h) eine spezifische immunologische Reaktion mit einem
spezifisch gegen das Glykoprotein gerichteten Anti-
körper.

- 20 2. Verfahren zur Anreicherung des Glykoproteins nach An-
spruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Protein-
lösung, in welcher das Glykoprotein immunologisch
nachgewiesen werden kann, mindestens einer der fol-
genden Maßnahmen unterworfen wird und die bezüglich
25 des Glykoproteins angereicherte Fraktion gewonnen wird:

- a) Zugabe von Neutralsalzen bis zur Ausfällung des
Glykoproteins;
- b) Molekularsiebfractionierung und Gewinnung der Frak-
30 tion mit einem Molekulargewicht von 25 000 bis
75 000;
- c) Adsorption des Glykoproteins an einen schwach
basischen Ionenaustauscher und Elution davon;
- d) Zugabe von wasserlöslichen Derivaten einer Acridin-

oder Chinolinbase im Bereich von pH 5 - 10 bis zu einer Endkonzentration von etwa 0,8 %;

- e) Behandlung der Glykoproteinlösung mit Hydroxylapatit;
 - f) Präparative Zonelektrophorese und Gewinnung der Zone
5 zwischen α_1 - und α_2 -Globulinen;
 - g) Behandlung der Proteinlösung mit einem Immunadsorbens.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß
als Proteinlösung ein Extrakt aus menschlichen Plazenten
10 verwendet wird.
4. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zur Gewinnung von Antiseren.
- 15 5. Antiserum erhältlich durch Immunisierung von Wirbeltieren mit einem Glykoprotein nach Anspruch 1.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

0000134

12 79 10 0134

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Art des Anspruchs	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG
A	FR - A - 2 183 151 (BEHRINGWERKE A.G.)	1-5	3 07 G 7/00 // G 01 N 33/16
A	DE - A - 2 256 168 (BEHRINGWERKE A.G.)	1-5	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 69, 103100m (1968) & Klin. Wochenschr., 46(18), 981-6 (1968)	1-5	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (M. CL.)
			C 07 G 7/00 A 61 K 37/02 A 61 K 35/14 A 61 K 35/16 A 61 K 35/22 A 61 K 35/50 A 61 K 39/00
			KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE
			X: von besonderer Bedeutung A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patent- familie, übereinstimmendes Dokument
X	Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	BAD ORIGINAL