

194355

30 OCT. 1951



1951

30 OCT 1951

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION, entidad británica, establecida en 1, Tilney Street, Londres W. 1. Inglaterra, por:

" PROCEDIMIENTO PARA SEPARAR GLOBULINAS BETA Y GAMMA DEL PLASMA SANGUINEO DE MAMIFEROS O AVES ".

-----

La memoria de la Patente británica nº 603.998 describe y reivindica un método para separar fibrinógeno y protrombina de la sangre de mamíferos, en particular de la humana.- Según se describe en dicha memoria, después de la precipitación de la protrombina el líquido que sobrenada se separa y se sigue tratando (cuando se desea un tratamiento



194355

ulterior para separar otras globulinas) para producir un líquido adecuado para la transfusión.-

5 El presente invento se refiere a la separación de estas otras globulinas mencionadas del líquido que sobrenada, en particular globulinas gamma y beta, y a la separación de una y otra globulina.- Esto se hace según el invento regulando el pH del líquido que sobrenada separado de la protrombina a un valor entre 5.00 y 6.50, diluyendo con agua destilada esterilizada hasta una fuerza iónica entre 0.12 y 0.012, 10 añadiendo gradualmente éter hasta poner el contenido de éste en la mezcla a 16-18.5 volúmenes por ciento y reduciendo al mismo tiempo la temperatura a un valor de -2 a -3.5º C. y dejando en reposo, y separando por fin el precipitado resultante que contiene la mayor parte de las globulinas beta y 15 gamma.-

La globulina beta se separa del precipitado resultante disolviéndolo en suficiente solución neutralizadora de un pH lo bastante bajo para ponerla en solución por debajo de, por ejemplo, un pH 4.8, añadiendo una solución neutralizadora de un pH más alto para poner el pH de la solución entre 20 4.8 y 5.3, añadiendo agua destilada esterilizada para reducir la fuerza iónica a 0.012 y 0.006, añadiendo éter para llevar el contenido de éste entre 8 y 12 volúmenes por ciento, dejando en reposo, y separando el precipitado resultante que es 25 principalmente de globulina beta.-

La globulina gamma se separa del líquido que sobrenada y del que se ha separado el precipitado de globulina



194355

beta, regulando el pH de este líquido entre 6.00 y 7.5 y añadiendo éter para poner el contenido del mismo de 10 a 18.5 volúmenes por ciento y separando el precipitado resultante de globulina gamma.-

5                    Todas estas operaciones (incluyendo el tratamiento del plasma sanguíneo) se efectúan a baja temperatura, esto es, entre 0º C y -3.5º C., en condiciones asépticas, y los reactivos se mantienen a temperatura similar o ligeramente superior, por ejemplo +2º C.; también en todas estas operaciones  
10 y en toda esta memoria, entendemos por éter el éter dietílico.

Se darán ahora detalles de las condiciones preferidas de la operación con sangre humana, pero debe entenderse que aproximadamente en las mismas condiciones se puede tratar la de otros mamíferos, por ejemplo, sangre de buey, y la sangre de aves.-  
15

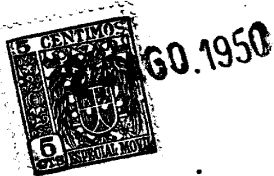
El procedimiento puede ser como se describe en la mencionada solicitud de patente británica nº 603.998 hasta la precipitación de protrombina, que puede realizarse convenientemente a un pH de 5.35, y la separación de la solución que sobrenada.-  
20

La globulina gamma se prepara del líquido que sobrenada en la globulina en tres periodos.-

#### PERIODO PRIMERO

Precipitación de globulina beta y gamma del líquido que sobrenada en la protrombina.-  
25

Este es una solución de proteína de 2 - 4% que tiene la composición: albúmina 70.8%; globulinas alfa y beta



194355

14.5%; globulinas gamma 14.7%.-- La solución contiene 10 volúmenes por ciento de éter, y la fuerza iónica es 0.12, calculada por las conocidas concentraciones de sal.--

5 El pH de la solución se regula a 5.50 por la adición de solución de bicarbonato sódico o de hidróxido sódico de molaridad adecuada, por ejemplo 0.5 M de Na HCO<sub>3</sub>.-- La solución se diluye añadiendo tres volúmenes de agua destilada para dar una fuerza iónica de 0.035.-- El contenido de éter de la mezcla se eleva gradualmente a 18.5 volúmenes por ciento, y al mismo tiempo la temperatura de la mezcla se reduce a -3,50 C., dejando en reposo la vasija de reacción en un baño de alcohol refrigerado a 50 C.-- Se forma un precipitado que se deja sedimentar durante la noche a -3,50 C.-- Todo lo posible del líquido que sobrenada se extrae con sifón y el sedimento se separa del resto centrifugando a -3.50 C.-- El líquido que sobrenada puede tratarse como en dicha solicitud de patente británica número 603.998, para producir un líquido adecuado para transfusión.--

20 El precipitado preparado en las condiciones arriba descritas contiene 90% de la globulina gamma existente en el material de partida, y su análisis electroforético es el siguiente:

Albúmina 10%; globulinas alfa y beta 46.5%; globulinas gamma, 43.5%.--

25 Las condiciones arriba expuestas son las preferidas, pero las globulinas pueden precipitarse del líquido que sobrenada en la protrombina en el siguiente campo de condiciones:

pH 5.00 - 6.50; I 0.12 - 0.012; éter 16 - 18.5 volúmenes por ciento; temperatura -20 C. a - 0.50 C.--

194355



La composición electrofolética del precipitado variará en función de las condiciones precisas de la precipitación.

#### PERIODO SEGUNDO

##### Separación de globulinas alfa y beta de la globulina gamma.-

5 El precipitado se disuelve en suficiente neutralizador de fosfato y acetato de pH 4.0 (H Ac 0.043 M - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.007 M) para ponerlo en solución a un pH de 4.6- La solución se enfría a 0º C., y por la adición de neutralizador de acetato y fosfato de pH 6.0 (H Ac 0.023 M - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.027 M), el pH  
10 se regula a 4.97 ± 0.02, se añade agua destilada para reducir la fuerza iónica a 0.010 y el éter se lleva a 9 volúmenes por ciento a 0º C.- El precipitado que se forma contiene el grueso de las globulinas alfa y beta, y se separa como se ha descrito arriba, después de dejar que tenga lugar el equilibrio  
15 durante la noche a 0º C.-

Las condiciones para la separación de las globulinas beta y gamma son críticas, pero se consigue la separación parcialmente en las condiciones:

20 pH 4.8 - 5.3; I 0.012 - 0.006; éter 8 - 12 volúmenes por ciento; temperatura 0º C.-

#### PERIODO TERCERO

##### Precipitación de globulina gamma del líquido que sobrenada en las globulinas beta.-

25 La globulina gamma se precipita del líquido que sobrenada regulando el pH a 6.50 - 6.75 con solución de bicarbonato sódico o hidróxido sódico, de molaridad adecuada, por ejemplo, 0.5 M Na HCO<sub>3</sub>, y llevando el éter a 18.5 volúmenes



1950

194355

por ciento a  $-3.52^{\circ}\text{C}$ .- La fuerza iónica es 0.025.- Este procedimiento precipitaría el 90% de la globulina gamma en solución.-

5 Las condiciones anteriores son las preferidas, pero la globulina gamma puede precipitarse en un campo de pH de 6.00 - 7.5 y con 10 - 18.5 volúmenes de éter por ciento.-

10 La globulina gamma así obtenida tiene electroforéticamente una pureza de 95%.- La pureza de la globulina beta es difícil de establecer por causa de su compleja conductividad electroforética, pero no está contaminada con albúmina ni globulina gamma.-

15 Las globulinas gamma pueden purificarse ulteriormente disolviendo el precipitado en neutralizador de fosfato de pH 7.0; I - 1.0, llevando la fuerza iónica a 0.05 por dilución con agua destilada esterilizada, y el éter a 18 volúmenes por ciento a temperatura de  $-3.52^{\circ}\text{C}$ .- La globulina gamma precipitada está libre de contaminación de albúmina y globulina beta.-

20 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña con fecha 30 de Agosto de 1.949, bajo el número 22.521/49, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto-Ley sobre Propiedad Industrial.-

o o O o o

o o o o

o o o

o

- 6 -

24

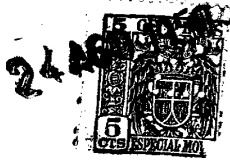


194355

NOTA -  
MALA REPRODUCCION  
DEL OBJETO DEL ORIGINAL

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

- 5                    19.- Un procedimiento para separar globulinas beta y gamma del plasma sanguíneo de mamíferos o aves, que comprende las operaciones, todas a baja temperatura, de clarificar el plasma por filtración, precipitar fibrinógeno por tratamiento con éter y dejando en reposo, separar el líquido
- 10                    que sobrenada del fibrinógeno, precipitar protrombina del líquido regulando el pH del mismo y dejándolo en reposo, separar el líquido que sobrenada de la protrombina, regular el pH de este último líquido a un valor entre 5.00 y 6.50, diluir con agua destilada esterilizada a una fuerza iónica
- 15                    entre 0.12 y 0.012, añadir éter para llevar el contenido de la mezcla a 16 - 18.5 volúmenes por ciento, reducir la temperatura de -2 a -3.50 °, y dejar en reposo y separar el precipitado resultante que contiene la mayor parte de las globulinas beta y gamma.-
- 20                    20.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual el pH del líquido que sobrenada separado de la protrombina se pone a 5.50.-



194355

30.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 20, en el cual el pH se lleva al valor especificado por la adición de 0.5 M de bicarbonato sódico.-

5 40.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 10, 20, o 30, en el cual la dilución se toma a una fuerza iónica de 0.035.-

10 50.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual la adición final de éter es tal que lleva el contenido del mismo a 18.5 volúmenes por ciento.-

60.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual la temperatura al tiempo de la adición final de éter se reduce a  $-3.50^{\circ}\text{C}$ .

15 70.- Un procedimiento para separar globulina beta del plasma sanguíneo de mamíferos y aves, que comprende las operaciones expuestas en cualquiera de los puntos anteriores, y luego disolver el precipitado final en suficiente solución neutralizadora de pH lo bastante bajo para ponerlo en la solución a pH 4.8, añadir una solución neutralizadora de pH más alto para poner la solución entre 4.8 y 5.3, añadir agua destilada esterilizada para reducir la fuerza iónica entre 0.012 y 0.006, añadir éter para llevar el contenido del mismo entre 8 y 12 volúmenes por ciento, dejar en reposo y separar el precipitado resultante, principalmente de globulina beta.-

20

25

80.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 70, en el cual la disolución se efectúa en un neutrali-



1950

194355

zador de acetato y fosfato de pH 4.0, en cantidad suficiente para producir una solución de pH 4.6, y el pH se regula a 4.97 - 0.02 añadiendo un neutralizador de acetato y fosfato de pH 6.0.-

5

92.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 72 u 82, en que la dilución con agua destilada se lleva a una fuerza iónica de 0.010.-

10

102.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 72, 82 ó 92, en el cual la adición de éter se lleva a 9 volúmenes por ciento.-

112.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 72 a 102, en el cual la disolución y operaciones subsiguientes se efectúan todas a 02 C.-

15

122.- Un procedimiento para separar la globulina gamma del plasma sanguíneo de mamíferos, que incluye las operaciones expuestas en cualquiera de los puntos 72 a 112, y luego regular el pH del líquido separado final de 6.00 a 7.5, y añadir éter para llevar el contenido de éste de 10 a 18.5 volúmenes por ciento, y separar el precipitado resultante de globulina gamma.-

20

132.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 122, en el cual el pH se lleva a 6.50 - 6.75.-

25

142.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 132, en el cual la regulación se efectúa con 0.5 M de bicarbonato sódico.-

152.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 122, 132 ó 142, en el cual el contenido de éter



194355

se lleva a 18,5 volúmenes por ciento.-

16º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 12º a 15º, en el cual las operaciones se efectúan a  $-3.5^{\circ}$  C.-

5                    17º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 12º a 16º, en la cual las globulinas gamma se purifican ulteriormente disolviéndolas en un neutralizador de fosfato de pH 7 y fuerza iónica 1.10, diluyendo con agua destilada hasta una fuerza iónica de 0.05, añadiendo  
10 éter hasta 18 volúmenes por ciento a la temperatura de  $-3.5^{\circ}$  C., y separando el precipitado de globulinas gamma.-

18º.- Procedimiento para separar globulinas beta y gamma del plasma sanguíneo de mamíferos o aves.-

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que entecede y para los fines que se han especificado.-

La presente Memoria consta de diez hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.-

Madrid, - 5 DIC. 1950

P. A.

Alberto de Elzeburu

Par Poder