

AÑO 1958

Expediente núm.

245586



REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

248586

245586

PATENTE DE INVENCIÓN

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una PATENTE DE INVENCIÓN por 20 años, en España

a favor de

MERCK & CO, Inc., de nacionalidad
norteamericana domiciliado en RAHWAY (New Jersey) E. U.
calle de East Lincoln Avenue núm. 126

por:

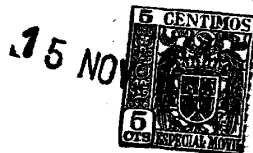
« Procedimiento para obtener properdina purificada y cen-
centrada ».

Nº 10709

Agente Sr. BOLIBAR

NU/.

Caso 6468



245586

P A T E N T E D E I N V E N C I Ó N

a favor de

MERCK & CO., Inc. - de nacionalidad norteamericana - domiciliado en RAHWAY (New Jersey, E.U.) 126 East Lincoln Avenue.

por:

"Procedimiento para obtener properdina purificada y concentrada".

-----:oOo:-----

M e m o r i a D e s c r i p t i v a.

Este invento se refiere a un procedimiento para obtener properdina purificada partiendo de substancias que

24558.8



la contengan, como humores o flúidos humanos y animales, incluso sangre integral y sus análogos. El invento concierne en particular a un procedimiento para obtener properdina purificada a partir del producto, derivado de sangre humana o animal, conocido entre los expertos por fracción I de Cohn.

Se han seguido hasta ahora diversos métodos para obtener properdina purificada, pero todos ellos han adolecido de limitaciones respecto al grado de concentración y de purificación, y a la facilidad y rapidez con que el producto puede prepararse.

Un objeto de este invento es proveer un método nuevo y sencillo para obtener properdina purificada.

Otro objeto del invento es proporcionar un procedimiento para enriquecer la concentración de properdina, sobre la que se presenta en la sangre o sus análogos y para purificar esa properdina.

Otro objeto más de este invento es proporcionar un nuevo procedimiento que produce una properdina de mejor calidad.

La properdina es una proteína del plasma que, en unión de otros factores, comunica actividad bacteriana a los sueros. Hasta ahora se ha observado que la presencia del sistema properdínico en la sangre de seres humanos o de animales parece estar profundamente relacionada con la inmunidad de los mismos frente a diversas formas de actividad bactericida o de otra índole. Se ha visto, por ejemplo, que los cobayos son muy susceptibles a infecciones, y sus sueros contienen cantidades relativamente pequeñas de properdina. En contraste, el suero de la rata, resistente a las infecciones, tiene una cantidad elevada de properdina, la

245586

15 NOV



más alta registrada entre los animales de sangre caliente.

5 La properdina está normalmente contenida en el caudal sanguíneo de las personas, y puede ser movili-
zada por el organismo humano. Al parecer, contribuye a proporcionar resistencia frente a la agresión bacteriana y el sistema properdínico se presenta ante todo como un mecanismo destinado por la naturaleza a asumir la defen-
10 sa contra la acción bacteriana mientras no se han formado aún anticuerpos. Por consiguiente, es de esencial importancia disponer de un producto de properdina con un grado de pureza y de concentración mucho mayor, y en una forma adecuada para introducirlo en el suero de animales hematermos.

15 Otros objetos y ventajas de este invento se apreciarán por la siguiente descripción.

De conformidad con este invento, se somete plasma sanguíneo al conocido método de fraccionamiento en etanol frío de Cohn, siguiendo técnicas corrientes, y se
20 obtiene así una pasta que los entendidos en la materia conocen por fracción I de Cohn. Esta pasta se suspende en una solución tope de citrato de glicina (glicocola), a una temperatura inferior a 0°C, y, después de agitar, se retira el fibrinógeno por centrifugación a menos de 0°C. El lí-
25 quido que sobrenada se trata, algo por encima de 0°C, añadiéndole una solución de acetato de cinc, para conseguir una concentración final de 0,02m aproximadamente. La solución de acetato de cinc se añade mejor poco a poco, agitando vigorosamente, y la solución final se deja reposar unas
30 18 horas. El precipitado de cinc se recoge por decantación

75 NOV



245586

y/o centrifugación.

5 El complejo de proteína y cinc así producido se disuelve a temperatura ambiente en ácido etilendiamin-tetraacético. El cinc y el ácido etilendiamin-tetraacético se retiran luego de la solución, mejor por diálisis, y al líquido resultante se añade tetrametafosfato sódico; después se reduce el pH, con lo que precipita abundante material, que se retira centrifugando o de otro modo.

10 El líquido que sobrenada al precipitar el metafosfato se ajusta luego aproximadamente a neutralidad, y la solución se liofiliza. El material liofilizado se suspende en un pequeño volumen de agua, se dializa en presencia de cloruro sódico o sustancia similar, y la solución dializada se clarifica por centrifugación y se filtra, para producir la solución estéril final, rica en pro-
15 perdina.

El siguiente ejemplo específico ilustra con más detalle un método preferido de llevar el invento a la práctica.

20 EJEMPLO: Preparación de properdina a partir de la fracción I de Cohn.

Se aplicó el método de fraccionamiento en etanol frío de Cohn a unos 1400 litros de plasma citratado, y se obtuvieron así 20 kg. de pasta de fracción I (fibrinógeno crudo). Esta pasta se suspendió en 10 vols. (200 li-
25 tros) de solución tope o amortiguadora de glicina fría (-3°C), con ayuda de un mezclador Blender. Con preferencia la solución tope se compone de

30	Citrato sódico	. 6H ₂ O	1,91 g.
	Cloruro sódico		13,6 g.



Acetato sódico . 3H ₂ O	7,94 g.
Glicina (glicocola)	75,07 g.
Etanol 3A	73,3 ml.
Agua, c.s. para	1 litro.

Ajustar a un pH 6,0 con ácido acético 0,4m.

5 La suspensión se agitó durante dos horas a -3°C, y el fibrinógeno se retiró por centrifugación a baja temperatura (-3°C). El líquido sobrenadante se almacenó a -3°C durante tres días, y precipitó algún material con aspecto de fibrinógeno, que se retiró centrifugando a -5°C; el precipitado se desechó.

10 Del líquido sobrenadante se precipitó a 42°C una fracción rica en properdina, añadiendo acetato de cinc en solución molar, para obtener una concentración final 0,02m aproximadamente (20ml. de acetato de cinc molar por litro de líquido sobrenadante).

15 La solución de acetato de cinc se agregó despacio, agitando vigorosamente, y la solución final se dejó reposar 18 horas a -2°C. El precipitado de cinc se recogió por decantación de la mayor parte del líquido sobrenadante y centrifugación del resto a -2°C; el precipitado de cinc pesó 650 gramos.

20 El complejo de proteína y cinc se disolvió a temperatura ambiente en 10 litros de ácido etilendiamin-tetraacético 0,25m (EDTA), con pH 7,2 agitando durante una media hora. El cinc y el EDTA se retiraron por diálisis de 25 cloruro sódico 0,15m a +2°C. (Se emplearon tres porciones de 200 litros de solución salina en un lapso de 72 horas). Una pequeña cantidad de material insoluble presente después de realizar se eliminó por centrifugación.

30 El líquido sobrenadante dializado se purificó además añadiendo tetrametafosfato sódico al 10% (100 ml. por

245586

15 NO



litro), y luego ácido clorhídrico al 5%, hasta alcanzar un pH de de 3,5 a 4,0. En estas condiciones precipitó abundante material, y la solución deajo reposar tres a cuatro horas, a -2°C, para que terminase la precipitación. El precipitado se retiró fácilmente centrifugando.

El líquido sobrenadante al precipitar con metafosfato se ajustó a un pH 7,0-7,2 con bicarbonato sódico molar, y se liofilizó la solución. El material liofilizado se suspendió en 3 litros de agua destilada, agitando durante media hora a -2°C.

Esta suspensión se realizó de NaCl 0,15m a +2°C, empleando dos porciones de 100 litros de solución salina en un lapso de 48 horas.

La solución dializada se clarificó por centrifugación a +2°C, y contenía 250 U. de properdina por mililitro (600 U. por miligramo de nitrógeno proteínico). Esta solución se pasó a través de una almohadilla esterilizante, como la Republic núm . S-6.

La solución final contenía 150 unidades de properdina por mililitro, con una actividad específica de 340 U por miligramo de nitrógeno proteínico. El volumen final era de 4 litros.

Se han ensayado, con resultados diversos, varios otros métodos para obtener properdina del líquido sobrenadante de metafosfato. La precipitación con sulfato amónico (más del 50%) y la diálisis consiguiente del precipitado obtenido dieron un material con una actividad específica de 300-400 U. por miligramo de nitrógeno proteínico, con rendimientos aproximados de 75% respecto al líquido sobrenadante de metafosfato. En cambio, precipitando con al-

245586

15 NOV



cohol (15) se obtuvo sólo un rendimiento de 40%. La purificación global obtenida hasta ahora ha sido de unas 400 veces para el producto final.

5 Por tanto, se apreciará que este método tiene por objeto la preparación de properdina a partir de la fracción I de Cohn, utilizando una solución de cinc para precipitar una fracción rica en properdina; en el mismo se aplica el tratamiento con tetrametafosfato sódico para retirar proteínas inertes, y el material inorgánico en exceso
10 se concentra y separa. Este método se ejecuta mucho más fácilmente y es mucho menos costoso que los conocidos hasta hoy. Se sabía que la properdina es una proteína rara del suero, casi especialmente adsorbida en cimbra, material de las paredes de células de levadura, muy caro. Tal método de
15 aislamiento depende del empleo de suero o plasma reciente, que contiene magnesio y varios componentes añejos, a la debida concentración y en condiciones de temperatura rigurosamente vigiladas.

20 En contraste con el suero fresco, el material de partida para la realización de este invento es una solución económica de levadura de la fracción I de Cohn, que contiene 7% de alcohol y glicocola molar. La properdina de esta solución varía considerablemente con la concentración inicial del plasma que se deriva, pero aun variando ampliamente este factor, se consigue con facilidad una concentración
25 más de cien veces mayor de acuerdo con este invento. El empleo de cinc como precipitante proporciona una concentración muy substancial de properdina, y la aplicación de tetrametafosfato sódico es
30 sumamente útil y el proceso de concentración, Aunque podría es-

15 NOV.



245588

perarse que la properdina precipitase dentro de un amplio margen de variación del pH, hemos comprobado que no precipita entre 4,2 y 3,2, sino que se encuentra en la solución sobrenadante. La precipitación con tetrametafosfato sódico puede efectuarse, por tanto, en la práctica del presente invento, dentro de ese margen de pH de 4,2 a 3,2. Precipitando con el tetrametafosfato se retira una cantidad grande de proteínas inertes, lo cual mejora todavía notablemente la pureza de la properdina obtenida.

Aunque la patente de los Estados Unidos núm. 2.726.235, otorgada a Rane y otros el 6 diciembre 1955, describe la separación de proteínas del plasma utilizando tetrametafosfato sódico, y parece indicar que la properdina (mencionada en la bibliografía como globulina beta) debe ser precipitada con las otras globulinas beta, hemos comprobado que la properdina permanece en la solución sobrenadante dentro de un margen bastante amplio de valores pH.

La utilidad de este invento se aprecia fácilmente. El sistema properdínico se ha descrito como un proteína que, con los cuatro componentes complementarios y magnesio se halla presente de modo normal en el suero humano y en el de otros animales. Este sistema tiene la propiedad de descomponer in vitro eritrocitos anormales; destruir bacterias, matar protozoos e inactivar ciertos virus. Esta substancia útil puede prepararse en condiciones mucho más económicas utilizando el método conforme a este invento.

Hemos comprobado que el procedimiento, como aquí se describe, proporciona una solución de properdina con varios centenares de unidades de concentración por mililitro, y de una pureza de cientos de unidades por mikigramo de ni-

16 NOV



245586

trógeno proteínico.

La preparación de la fracción I de Cohn es bien conocida en el ramo, y se describe completamente en el Journal of the American Chemical Society, vol. 68. pág. 459 (1946), por E. J. Cohn y otros.

5

-----: N O T A :-----

Se reivindica como objeto de esta patente :

10

1.- Procedimiento para obtener properdina purificada y concentrada a partir de la fracción I de Cohn el cual comprende tratar dicha fracción con una solución de sal de cinc, y retirar los precipitados de cinc.

15

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en que la fracción I de Cohn se trata con una solución de acetato de cinc.

20

3.- Procedimiento para obtener properdina purificada y concentrada, a partir de la fracción I de Cohn, el cual comprende suspender dicha fracción I de Cohn en solución tope de glicina alcohólica, a menos de 0°C; retirar de la suspensión el fibrinógeno insoluble, a una temperatura inferior a 0°C, aproximadamente; añadir una solución de sal de cinc, y retirar el precipitado de cinc.

25

4.- Procedimiento para obtener properdina purificada y concentrada, a partir de la fracción I de Cohn, el cual comprende añadir una solución de sal de cinc, retirar el precipitado de cinc, disolver este precipitado en ácido etilendiamin-tetraacético, agregar ácido clorhídrico para obtener un pH aproximado de 3,2 a 4,2, y retirar el precipitado, para obtener la properdina purificada y concentrada.

30

245586

15 NOV



5.- Procedimiento para obtener properdina purificada y concentrada, a partir de la fracción I de Cohn, el cual comprende suspender un volumen dado de dicha fracción I de Cohn en unos 5 a 10 vols. de solución alcohólica tope de glicina, retirar de dicha suspensión el fibrinógeno insoluble, agregar al líquido sobrenadante una solución de acetato de cinc, agitar, retirar el precipitado de cinc, disolverlo en ácido etilendiamin-tetraacético, retirar el cinc y el ácido etilendiamintetraacético por diálisis de cloruro sódico, agregar tetrametafosfato sódico al líquido sobrenadante dializado, ajustar el pH del líquido aproximadamente a 3,2-4,2, retirar el precipitado, ajustar el líquido sobrenadante obtenido a un pH aproximado de 7, liofilizar el material resultante, dializarlo de cloruro sódico aproximadamente 0,15, clarificar y filtrar, para obtener la properdina purificada y concentrada.

6.- Procedimiento para obtener properdina purificada y concentrada, a partir de la fracción I de cohn contenida en una solulavadora tope de glicina en alcohol; el cual comprende retirar de dicha suspensión el fibronógeno insoluble, añadir una solución de cinc al líquido sobrenadante, agitar, retirar el precipitado de cinc, disolver éste en ácido etilendiamin-tetraacético ácido por diálisis, añadir tetrametafosfato sódico al líquido sobrenadante dializado, agregar ácido clorhídrico para obtener un pH aproximado de 3,2 a 4,2, retirar el precipitado, ajustar el líquido sobrenadante obtenido a un pH aproximado de 7, liofilizar el material resultante dializar el cloruro sódico aproximadamente 0,15 clarificar y filtrar, para obtener la properdina purificada y concentrada.

7.- Procedimiento para obtener properdina puri-

15 N

245586



ficada y concentrada, a partir de la fracción I de Cohn, el cual comprende suspender un volumen dado de dicha fracción en unos cinco a diez volúmenes de solución tope de citrato de glicina, compuesta de

5	Citrato sódico	.6H ₂ O	1,91 g.
	Cloruro sódico		13,6 g.
	Acetato sódico	.3H ₂ O	7,94 g.
	Glicina		75,07 g.
	Etanol 3A		73,3 ml.
	Agua, c.s. para		1 litro.

ajustar a un pH 6,0 con ácido 0,4m, a una temperatura inferior a 0°C. retirar de dicha suspensión el fibrinógeno insoluble a menos de 0°C aproximadamente, agregar una solución de acetato de cinc, a concentración molar aproximada al líquido sobrenadante; agitar, retirar el procedimiento de cinc, disolverlo en ácido etilendiamin-tetraacético aproximadamente 1/4m, de pH aproximado 7,2; retirar el cinc y el ácido etilendiamin-tetraacético por diálisis frente a cloruro sódico 0,5m aproximadamente; agregar tetrametafosfato sódico al líquido sobrenadante dializado; ajustar a un pH aproximado de 3,5 a 4 con ácido clorhídrico, retirar el precipitado, ajustar el líquido sobrenadante a un pH aproximado de 7, liofilizar el material resultante, dializarlo de cloruro sódico aproximadamente 0,15m. clarificarlo y filtrarlo en condiciones estériles, para obtener la properdina purificada y concentrada.

8.- Procedimiento para obtener properdina purificada y concentrada.

Esta memoria consta de once páginas escritas por una sola cara.

BARCELONA, 15 NOV. 1958

P.A.