



306900

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

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,  
sus territorios y plazas de soberanía, a  
favor de:

D. FELIX GALLARDO CARRERA

de nacionalidad española, domiciliado en  
Barcelona, Avda. General Goded, núm. 18,  
relativa a:

"PERFECCIONAMIENTOS EN LOS PROCEDIMIENTOS  
DE OBTENCION DE CERULOPLASMINA A PARTIR DE  
FRACCIONES PLASMATICAS".

=====



306900

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente Patente de Invención, se contrae, conforme se indica en su enunciado, a unos perfeccionamientos en los procedimientos de obtención de ceruloplasmina

5. a partir de fracciones plasmáticas, específicamente en los que parten de la fracción III del método de H.S. Nitschmann P. Kistler y W. Lergier, en lugar de la fracción IV ó IV-1 obtenida por el método de Cohn. - - - - -

10. Como es conocido, la ceruloplasmina es una proteína contenida en la sangre que presenta cobre en su molécula, y cuya ausencia produce anomalías en el organismo humano, como la enfermedad de Wilson. - - - - -

15. Esencialmente los presentes perfeccionamientos se caracterizan por el hecho de que una masa de fracción III de plasma, obtenida según el método de Nitschmann, Kistler y Lergier, se trata con agua, a temperatura comprendida entre 0 y 5°C, para obtener con agitación y posterior centrifugación, un precipitado que se trata con acetato sódico al 0,15 M, a pH entre 4,8 y 5,5 y temperatura de 0 a 5°C,

20. agitándose y centrifugando para obtener un líquido, contenedor de la ceruloplasmina, al cual se le adiciona un 5% de Hyflo, tras lo que se filtra, se baja el pH entre 4,5 y 5 y se calienta al baño maría a 60-70°C durante unos diez minutos, agitando continuamente, llevándose a cabo,

25. seguidamente, una centrifugación entre 0 y 5°C, resultando

306900

DIC 18



un líquido que se trata con un 5% de Hyflo, se filtra a 0-5°C y se neutraliza a pH 5,5-6, tras lo cual se absorbe la ceruloplasmina mediante la cantidad justa de resina dietilaminoetil (DEAE-Sephadex), se filtra por Buchner, se

5. lava con solución tampón, se aumenta la fuerza iónica de 0,15M a 0,3M, se filtra por Buchner al vacío y se recoge la solución de ceruloplasmina en un quitasatos. - - - -

Para facilitar la comprensión de las precedentes ideas, se describe seguidamente un ejemplo de realización

10. de los presentes perfeccionamientos, el cual deberá ser considerado como desprovisto de todo alcance limitativo, dado su carácter ilustrativo. - - - - -

Se parte de una fracción III obtenida según el método de Nitschmann, Kistler y Lergier, del plasma de

15. diferentes dadores. Un kilogramo de esta fracción se trata con 10 volúmenes de agua, a una temperatura entre 0 y 5°C, se agita hasta obtener una perfecta suspensión y se centrifuga desechando el sobrenadante, obteniendo un precipitado, que se llamará igualmente fracción III, de

20. color azul verdoso de donde se extraerá la ceruloplasmina.

Dicho precipitado se trata con 5 volúmenes de acetato sódico al 0,15M, a pH entre 4,8 y 5,5 y a temperatura entre 0 y 5°C. Se agita hasta obtener una perfecta sus-

25. pensión, se centrifuga a dicha temperatura y se recoge la fase líquida en la que está contenida la ceruloplasmina.-

Para purificar el producto, se trata dicho líquido con un 5% de Hyflo, filtrando la solución para obtener un

306900



9 DIC 1964

- líquido turbio de color azul algo más marcado, pero manteniendo el color verdoso. Se baja el pH entre 4,5 y 5 con ácido clorhídrico decinormal. Se calienta con agitación al baño maría durante aproximadamente diez minutos,
5. a una temperatura entre los 60 y 70°C. Transcurrido el tiempo de calentamiento, se centrifuga de 0 a 5°C con lo que se obtiene un líquido, contenedor de la ceruloplasmina, que se trata con un 5% de hyflo y se filtra a la indicada temperatura. Seguidamente se neutraliza con hidróxido
10. sódico decinormal, a pH entre 5,5 y 6, midiendo el volumen de este líquido. La purificación final se efectúa con resina de dietilaminoetil (DEAE-SEPHADEX), con la cual se absorbe la ceruloplasmina añadiendo la cantidad exacta de resina, no debiendo existir exceso de ésta en la solución. Una vez la ceruloplasmina es absorbida, se filtra
15. por Buchner para escurrir totalmente la resina. Se lava ésta con solución tampón, se pesa la resina escurrida y se calcula la cantidad de cloruro sódico necesario para aumentar la fuerza iónica de 0,15M a 0,3M, adicionando la
20. cantidad calculada con agitación. - - - - -

Seguidamente se filtra por Buchner al vacío, observándose como lentamente la solución de ceruloplasmina de intenso color azul, retenida por la resina, va reuniéndose en el quitasatos estéril, obteniéndose una concentración

25. aproximada de ceruloplasmina del 5% con una pureza muy elevada. - - - - -

Habiendo descrito las características de los presentes perfeccionamientos se hace constar que en los mis-

306900



mos podrán introducirse cuantas variantes de detalle pueda aconsejar la experiencia, siempre que con ello no se desvirtúe su esencialidad que es la que se resume y concreta en la primera de las reivindicaciones que siguen: - - - - -

5.

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España y todos sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - - - -

10.

R E I V I N D I C A C I O N E S

1. Perfeccionamientos en los procedimientos de obtención de ceruloplasmina a partir de fracciones plasmáticas, específicamente en aquellos procedimientos que parten de la fracción III del plasma sanguíneo obtenida por el método preconizado por H.S. Nitschmann, P. Kistler y W. Lergier, caracterizados por el hecho de que una masa de dicha fracción III se trata con agua, a temperatura comprendida entre 0 y 5°C, para obtener con agitación y posterior centrifugación, un precipitado que se trata con acetato sódico al 0,15M, a pH entre 4,8 y 5,5 y temperatura de 0 a 5°C, agitándose y centrifugando para obtener un líquido, contenedor de la ceruloplasmina, al cual se le adiciona un 5% de Hyflo, tras lo que se filtra, se baja el pH entre 4,5 y 5 y se calienta a 60-70°C al baño maría durante unos diez minutos, agitando continuamente, llevándose a cabo, seguidamente una centrifugación entre 0 y 5°C, resultando un líquido que se trata

15.

20.

25.



306900

con un 5% de Hyflo, se filtra a 0-5°C y se neutraliza a pH 5,5-6, tras lo cual se absorbe la ceruloplasmina mediante la cantidad justa de resina dietilaminoetil (DEAE-Sephadex), se filtra por Buchner, se lava con solución tampón, se aumenta la fuerza iónica de 0,15M a 0,30M, se filtra por Buchner al vacío y se recoge la solución de ceruloplasmina en un quitasatos. - - - - -

5.

2. "PERFECCIONAMIENTOS EN LOS PROCEDIMIENTOS DE OBTENCION DE CERULOPLASMINA A PARTIR DE FRACCIONES PLASMATICAS". - - - - -

10.

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de seis hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID, 9 DIC. 1964

*F.A. Corell Suñol*

M. CORELL SUÑOL