

14 DIC



307094

P A T E N T E   D E   I N T R O D U C C I O N

por DIEZ años

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

D. JAIME FERRE FERRERES

de nacionalidad española, domiciliado en Barcelona, P<sup>o</sup> Exposición, núm. 62, relativa a:

"METODO PARA LA OBTENCION DE CERULOPLASMINA"

=====



307094

5. La presente Patente de Introducción se contrae, conforme se indica en su enunciado, a un método para la obtención de ceruloplasmina, específicamente a uno que parte de la fracción III del plasma humano obtenida según el procedimiento preconizado por H.S. Nitschmann, P. Kistler y W. Lergier, en lugar de la fracción IV o IV-1 obtenida por el método de Cohn. - - - - -

10. La ceruloplasmina es una proteína de intenso color azul, debido a su unión molecular con el cobre. Es una de las proteínas más estables dada su resistencia frente a los disolventes y al calor. Sin embargo presenta menos resistencia en la liofilización, desnaturalizándose parte de proteína durante el proceso. Sometida a la acción de un reductor (ácido ascórbico), pierde fácilmente el color azul al romperse la unión molecular entre cobre y proteína, dando lugar a la formación de la apoceruloplasmina . La cantidad de ceruloplasmina en un litro de plasma es de 150 a 300 mlgs. El déficit de ceruloplasmina en el organismo humano produce estados anormales, conocidos como la enfermedad de Wilson. - - - - -

15.

20.

25. Los ensayos realizados con varios pacientes esquizofrénicos, inyectándoles ceruloplasmina por vía intravenosa, demostraron la gran importancia terapéutica de esta proteína. La reacción de hipotensión producida en algunos de los casos tratados, fijó la atención en buscar un método de purificación con el cual pudiera obtenerse una

307094

14 DIC



ceruloplasmina que, al ser inyectada, no produjera ninguna reacción secundaria. - - - - -

- El método objeto de la presente Patente se caracteriza esencialmente por el hecho de que una masa de la
5. fracción III, obtenida del plasma humano por el procedimiento de M.S, Nitschmann, P. Kistler y W. Lergier, se trata con agua a temperatura comprendida entre 0<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup>C, ajustando el pH entre 5 y 5,5 y su conductividad entre 1.000 y 1.200 ohms/cm, tras lo que se agita y se centrifuga entre 0 y 5<sup>o</sup>C,
  10. tratando el precipitado con solución tampón 0.15 M de acetato sódico en la proporción de 5 veces el peso de precipitado, ajustando el pH a 5-5,5, agitando a temperatura de 0-5<sup>o</sup>C, dejándolo unas horas a temperatura ambiente, y centrifugando a esta misma temperatura, tras lo cual se recoge el sobrenadante, que se trata con un 25% de alcohol etílico y un 3%
  15. de cloroformo, dejándolo reposar a temperatura ambiente, para pasarlo a una cámara frigorífica a 0-5<sup>o</sup>C durante un tiempo de reposo igual al anterior, realizándose seguidamente una centrifugación a 0-5<sup>o</sup>C cuyo precipitado se extrae con solución tampón 0,15 M de acetato y cloruro sódico, luego se cen-
  20. trifuga, se ajusta el pH a 4,5-5 y se lleva a una temperatura de 0 a 5<sup>o</sup>C, agitando seguidamente hasta obtener una solución transparente, que se calienta al baño maría, con agitación, a una temperatura comprendida entre 60 y 70<sup>o</sup>C durante unos diez
  25. minutos, llevándose a cabo seguidamente una centrifugación a 0<sup>o</sup>-5<sup>o</sup>C. cuyo sobrenadante se trata con un 5% de Hyflo, agitando y filtrando en Buchner, con lo que resulta un líquido que se neutraliza a pH, 5,5-6, manteniendo la temperatura de 0 a 5<sup>o</sup>C, para seguidamente concentrar la ceruloplasmina con
  30. resina dietilaminoetil (Sephadex), previamente tamponada con el tampón precitado, hasta que la solución reste inodora,



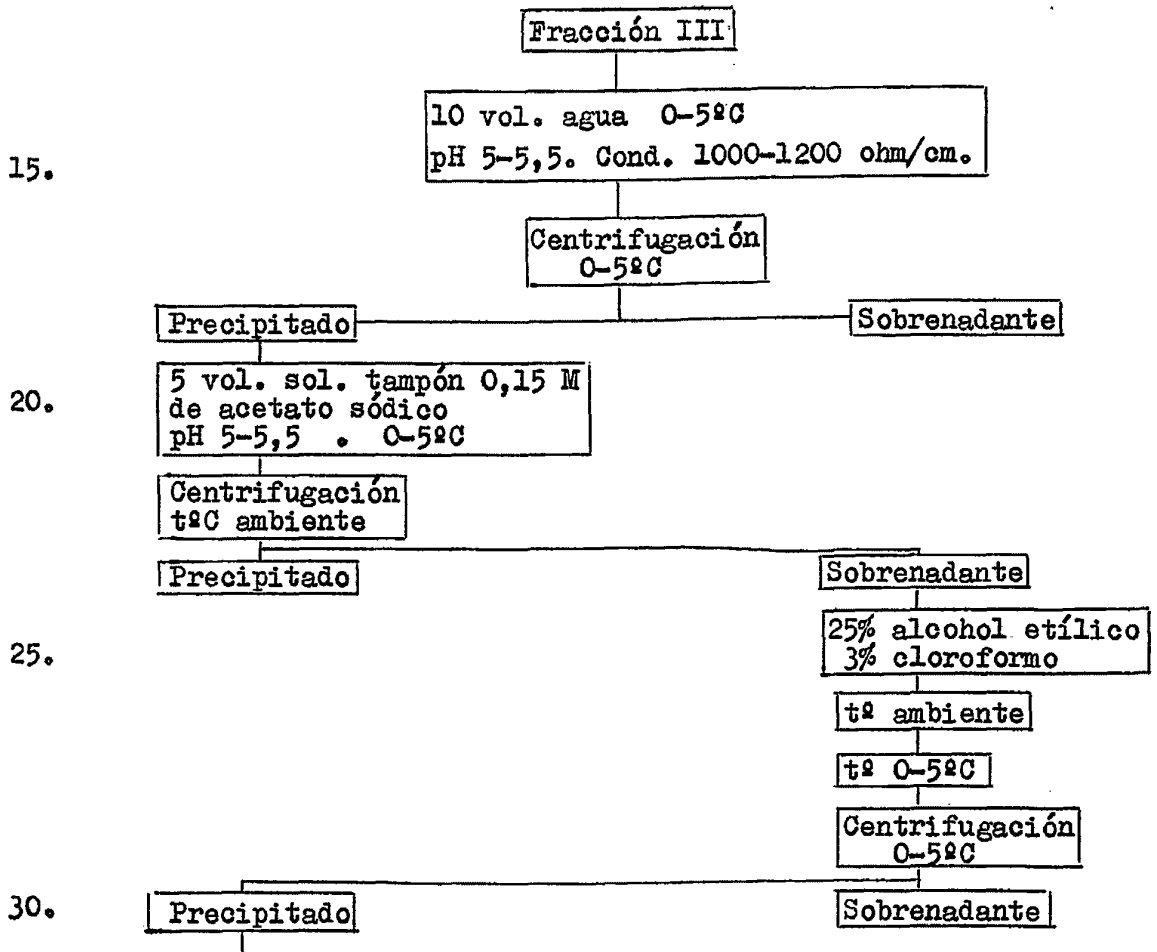
filtrando al vacío, lavando con solución tampón y escurriendo añadiendo con agitación la necesaria cantidad de cloruro sódico, con lo cual aumenta la fuerza iónica a 0,3 M, colocando la resina en un Buchner y aplicando vacío, se recoge la ceruloplasmina en un kitasatos. - - - - -

5.

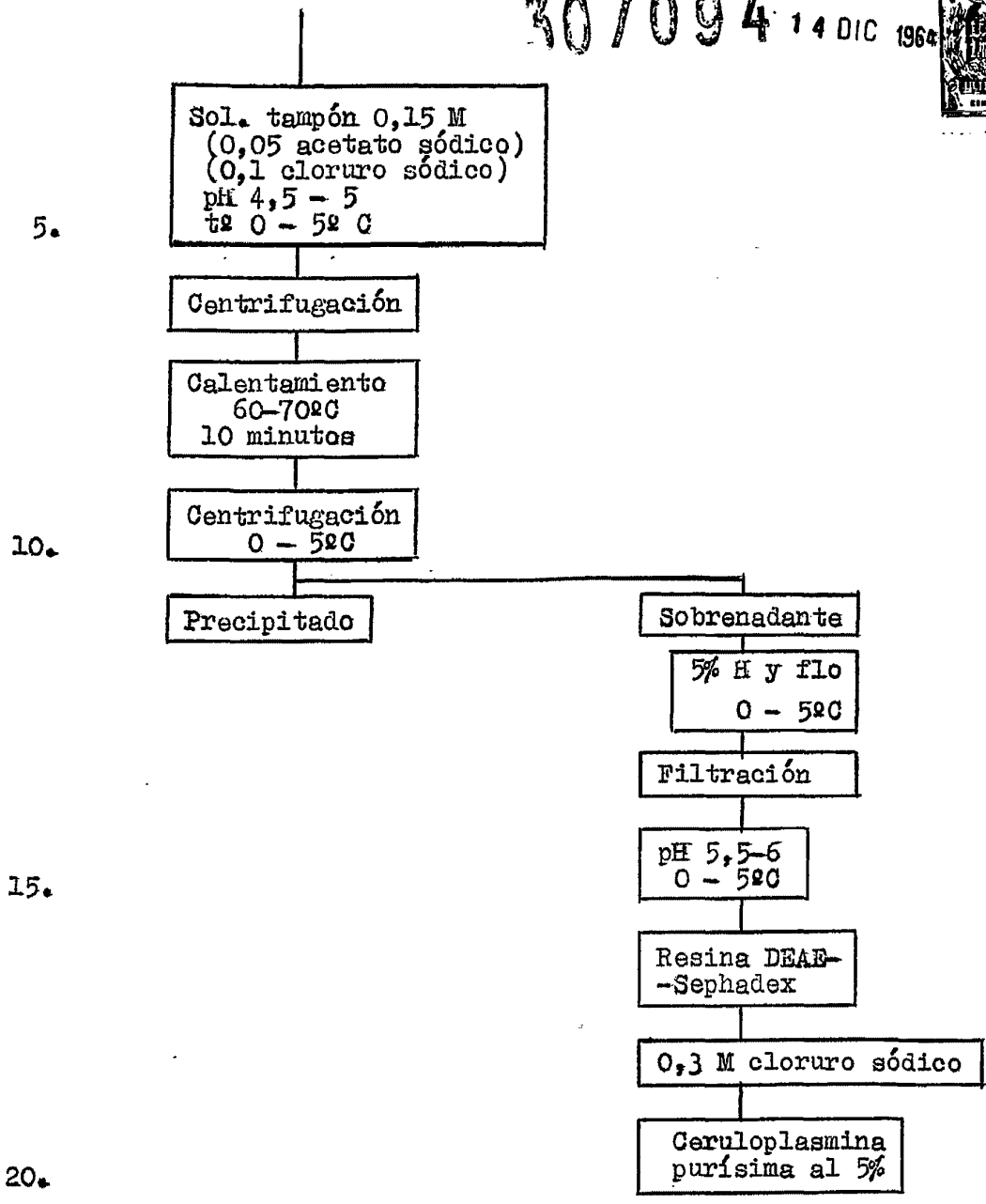
Para facilitar la comprensión de las ideas precedentes, se describe seguidamente una forma preferente de realización del presente método de obtención de ceruloplasmina, debiéndose interpretar como desprovisto de todo alcance limitativo respecto de la protección legal que se solicita. - - - - -

10.

Seguidamente se representa esquemáticamente el método que más adelante se describirá con detalle:



307094 14 DIC 1964



Se trata una masa de fracción III del plasma humano, obtenida según el método de H.S. Nitschmann, P. Kistler y W. Lergier, con agua a una temperatura comprendida entre 0 y 5º C, en la proporción de 10 volúmenes de agua por cada kilogramo de fracción III.

Se ajusta el pH entre 5 y 5,5, y la conductividad entre 1.000 y 1.200 ohms/cm. La mezcla se agita durante varias horas y se centrifuga seguidamente a una tempe-



ratura comprendida entre 0 y 5°C, obteniéndose un precipitado de color verde oscuro, que contiene la ceruloplasmina, y un líquido sobrenadante, que se desecha. - - - - - e

- 5. A continuación se trata el precipitado con solución tampón 0,15 M de acetato sódico, en la proporción de cinco veces el peso de precipitado obtenido en la centrifugación, ajustándose el pH entre 5 y 5,5 agitando durante varias horas a la temperatura de 0 a 5°C y centrifugando, a esta temperatura, para obtener un líquido sobrenadante de color azul-verdoso, que contiene la ceruloplasmina, y un precipitado que se desecha. - - - - -
- 10.

El líquido se trata con un 25% de alcohol etílico y un 3% de cloroformo, dejándolo reposar a temperatura ambiente durante unas horas, para pasarlo a una cámara frigorífica a 0-5°C durante un período de tiempo igual al anterior, tras lo cual se centrifuga a temperatura entre 0 y 5°C y se obtiene una pasta de color azul pastel, desechándose el sobrenadante incoloro. - - - - -

- 15.
- 20. Para la purificación de la ceruloplasmina contenida en dicha pasta, se disuelve ésta en solución tampón 0,15 M, en la proporción de 0,05 M de acetato sódico y 0,1 M de cloruro sódico, acidificándolo con ácido clorhídrico decimonormal a pH entre 4,5 y 5, y a temperatura de 0 a 5°C, agitando hasta obtener una suspensión homogénea, la cual se centrifuga y se obtiene una solución de color azul intenso.-
- 25.

Esta solución se calienta al baño maría con agitación, a una temperatura comprendida entre los 60 y 70°C durante un período de unos diez minutos. Seguidamente se

307094

14 Dic 1964



centrifuga a 0-5°C, recogiendo el sobrenadante que contiene la ceruloplasmina y desechando el precipitado, para tratar aquél con un 5% de hyflo, agitando y filtrando por Buchner.

5. El líquido transparente se neutraliza con hidróxido sódico decinormal hasta pH entre 5,5 y 6, manteniendo la temperatura anterior. Para concentrar la ceruloplasmina diluida, se trata dicho líquido con resina dietilaminoetil (DEAE-Sephadex), previamente tamponada con el mismo tampón antes empleado, añadiéndose la cantidad necesaria para que toda la ceruloplasmina quede adsorbida, debiendo quedar la solución completamente incolora. Seguidamente se filtra por Buchner utilizando el vacío, se lava la resina con solución tampón y se escurre. - - - - -
- 10.

15. Para extraer la ceruloplasmina de la resina, se aumenta su fuerza iónica de 0,15 M a 0,30 M con cloruro sódico cristalizado, agitando continuamente al añadir éste.

A continuación se vuelve a colocar la resina en un Buchner y, aplicando el vacío, se recoge la ceruloplasmina en un kitasatos. - - - - -

20. La concentración de la ceruloplasmina, obtenida con elevado grado de pureza, es del 5%, debiéndose guardarse para su conservación a 2°C. - - - - -

25. Habiendo descrito el método en cuestión, se hace constar que en el mismo podrá introducirse cuantas variantes de detalle aconseje la experiencia, siempre que con ello no se desvirtúe su esencialidad, que es la que se concreta en la primera de las reivindicaciones que siguen. - - - - -

N. O. T. 307094



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

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

- 5. 1. Método para la obtención de ceruloplasmina, específicamente a uno que parte de la fracción III del plasma humano obtenida por el procedimiento preconizado por H.S. Nitschmann, P. Kistler y W. Lergier, caracterizado por el hecho de que se parte de una masa de dicha fracción, que es
- 10. tratada con agua a temperatura comprendida entre 0º y 5ºC, ajustando el pH entre 5 y 5,5 y su conductividad entre 1.000 y 1.200 ohms /cm, tras lo que se agita y se centrifuga entre 0 y 5ºC, tratando el precipitado con solución tampón 0,15 M de acetato sódico, preferentemente, en la proporción
- 15. de 5 veces el peso de precipitado, ajustando el pH a 5-5,5 agitando a temperatura de 0-5ºC, y centrifugando a la misma temperatura, tras lo cual se recoge el sobrenadante, que se trata con un 25% de alcohol etílico y un 3% de cloroformo, dejándolo reposar a temperatura ambiente, para pasarlo a
- 20. una cámara frigorífica a 0-5ºC durante un tiempo de reposo igual al anterior, realizándose seguidamente una centrifugación a 0-5ºC cuyo precipitado se suspende en solución tampón 0,15 M de acetato y cloruro sódico, se centrifuga, se ajusta el pH a 4,5-5 y se lleva a una temperatura de 0 a 5ºC,
- 25. agitando seguidamente hasta obtener una solución que se calienta al baño maría, con agitación, a una temperatura comprendida entre 60 y 70ºC durante unos diez minutos, llevándose a cabo seguidamente una centrifugación a 0-5ºC cuyo sobrenadante se trata con un 5% de Hyflo, agitando y filtrando en

307094

14 DIC.



- Buchner, con lo que resulta un líquido transparente que se neutraliza a pH 5, 5-6, manteniendo la temperatura de 0 a 5°C, para seguidamente concentrar la ceruloplasmina con resina dietilaminoetil (DEAE-SEPHADEX), previamente tamponada con el tampón precitado, hasta que la solución reste incolora, filtrando al vacío, lavando con solución tampón y escurriendo, después de lo cual se aumenta la fuerza iónica a 0,3 M con cloruro sódico y se agita, colocando la resina en un Buchner y aplicando vacío, se recoge la ceruloplasmina en un kitasatos. - - - - -
- 5.
  - 10.

2.--"METODO PARA LA OBTENCION DE CERULOPLASMINA". - - - - -

- Todo ello tal como se describe y reivindica en la presente memoria que consta de nueve hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.
- 15.

MADRID, 14 DIC. 1964

P.A. *[Handwritten signature]*

M. CURELL SUÑOL