

14 DIC



307095

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^o. Exposición núm. 62, relativa
a:

"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION Y PURIFI-
CACION DE CERULOPLASMINA A PARTIR DE FRAC-
CIONES PLASMATICAS"

=====

14 DIC 1964



307095

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente Patente de Introducción se refiere, conforme se indica en su enunciado, a un procedimiento para la obtención y purificación de ceruloplasmina a partir de fracciones plasmáticas. - - - - -

5.

Dicho procedimiento permite la obtención de una ceruloplasmina de alto grado de pureza, partiendo de la fracción III del método de H.S. Nitschmann, P. Kistler y W. Lergier, en lugar de partir 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 miligramos. El déficit de ceruloplasmina en el organismo humano produce estados anormales, conocidos como la enfermedad de Wilson. - - - - -

15.

20.

Los ensayos realizados a varios pacientes esquizo-

14 DIC



307095

frénicos inyectándoles ceruloplasmina humana por vía intravenosa, demostraron la gran importancia de esta proteína terapéuticamente. La reacción de hipotensión producida en alguno de los casos tratados, fijó nuestra

5. atención en buscar un método de purificación con el cual pudiéramos obtener una ceruloplasmina que al ser inyectada no produjera ninguna reacción secundaria. - - - - -

Para comprobar el grado de pureza de la ceruloplasmina obtenida, se han verificado análisis de electroforesis sobre papel y acetato de celulosa, inmunoelectroforesis, contenido en proteínas de las soluciones obtenidas, pirógenos, pruebas de presión arterial utilizando gatos para comprobar el efecto hipotensor, y finalmente ensayo de histaminas en intestino de conejo. - - - - -

10.

En las electroforesis sobre papel y acetato de celulosa, se obtuvieron bandas perfectamente aisladas y definidas sin ninguna traza de otras proteínas. La inmunoelectroforesis reveló la presencia de una ligera y difusa línea de precipitación junto a la ceruloplasmina. Las

20. pruebas con gatos dieron también buenos resultados, al igual que las de histaminas. - - - - -

15.

Este procedimiento para la obtención de ceruloplasmina, partiendo de la fracción III obtenida por fraccionamiento del plasma sanguíneo mediante el método preconizado por H.S. Nitschmann, P. Kistler y W. Lergier, se

25. caracteriza por el hecho de que una masa de dicha fracción III, que previamente se ha tratado con 10 volúmenes de



307095

14 DIC

1964

- agua estéril y apirógena a 0 - 5°C se ha agitado hasta obtener una suspensión perfecta y se ha centrifugado desechando el sobrenadante, se trata el precipitado resultante contenido en el contenedor de la ceruloplasmina, con 9 volúmenes
5. de cloruro sódico 0,1 molar con un pH comprendido entre 4,5 y 5,5 y temperatura entre 0 y 5°C, se agita y se añaden 5 volúmenes de acetona aumentando la temperatura durante la adición de ésta hasta alcanzar la temperatura ambiente, tras lo cual se continúa la agitación, se neutraliza a un pH comprendido entre 6,5 y 6,9 y se deja en reposo en la oscuridad durante unas horas para centrifugar seguidamente el líquido a una temperatura comprendida entre -3 y -6°C desechando el precipitado y se añade un 5% de Hyflo al líquido sobrenadante, procediéndose a una
 10. agitación con filtrado, también a la temperatura últimamente citada, se añade acetona hasta alcanzar una concentración del 55%, todo ello sin sobrepasar los -8°C y ajustando el pH entre 6,5 y 6,9 y se deja el líquido durante unas horas en la oscuridad, para centrifugar a la misma
 15. temperatura, recogiendo el precipitado que contiene la ceruloplasmina 2 y conservándolo a -8°C, tras lo cual se pesa dicho precipitado y se disuelve en 5 volúmenes de solución tampón 0,15 molar a una temperatura comprendida entre + 2 y -2°C, se baja el pH entre 4,6 y 4,9, se calienta al baño maría durante un período de tiempo no superior a los 10 minutos y a una temperatura comprendida
 20. entre los 60 y 70°C, se centrifuga a una temperatura de -3 a 6°C, dejando el líquido a una temperatura comprendida entre + 2 u -2°C, se filtra a la misma temperatura y se
 25. neutraliza a un pH comprendido entre 5,5 y 6, se añade a la solución resina DEAE-SEPHADEX agitando continuamente,
 - 30.

307095



con lo cual queda absorbida toda la ceruloplasmina, se filtra por Buchner al vacío lavando a continuación la resina y se añade, agitando, cloruro sódico para pasar la solución de ceruloplasmina absorbida por la resina de 0,15 M a 0,3 M, se pasa la resina a un Buchner provisto de placa filtrante para escurrir totalmente la ceruloplasmina, utilizando el vacío, con lo que se obtiene ceruloplasmina concentrada al 5% que se conserva a 2°C sin sufrir ninguna alteración. - - - - -

5. Para facilitar la comprensión de las ideas precedentes se describe seguidamente una forma preferente de realización del objeto de la presente Patente, debiéndose considerar como desprovista de todo alcance limitativo, dado su carácter ilustrativo, con respecto a la protección legal que se solicita: - - - - -

10. La fracción III de que partimos está obtenida de plasma de diferentes dadores. - - - - -

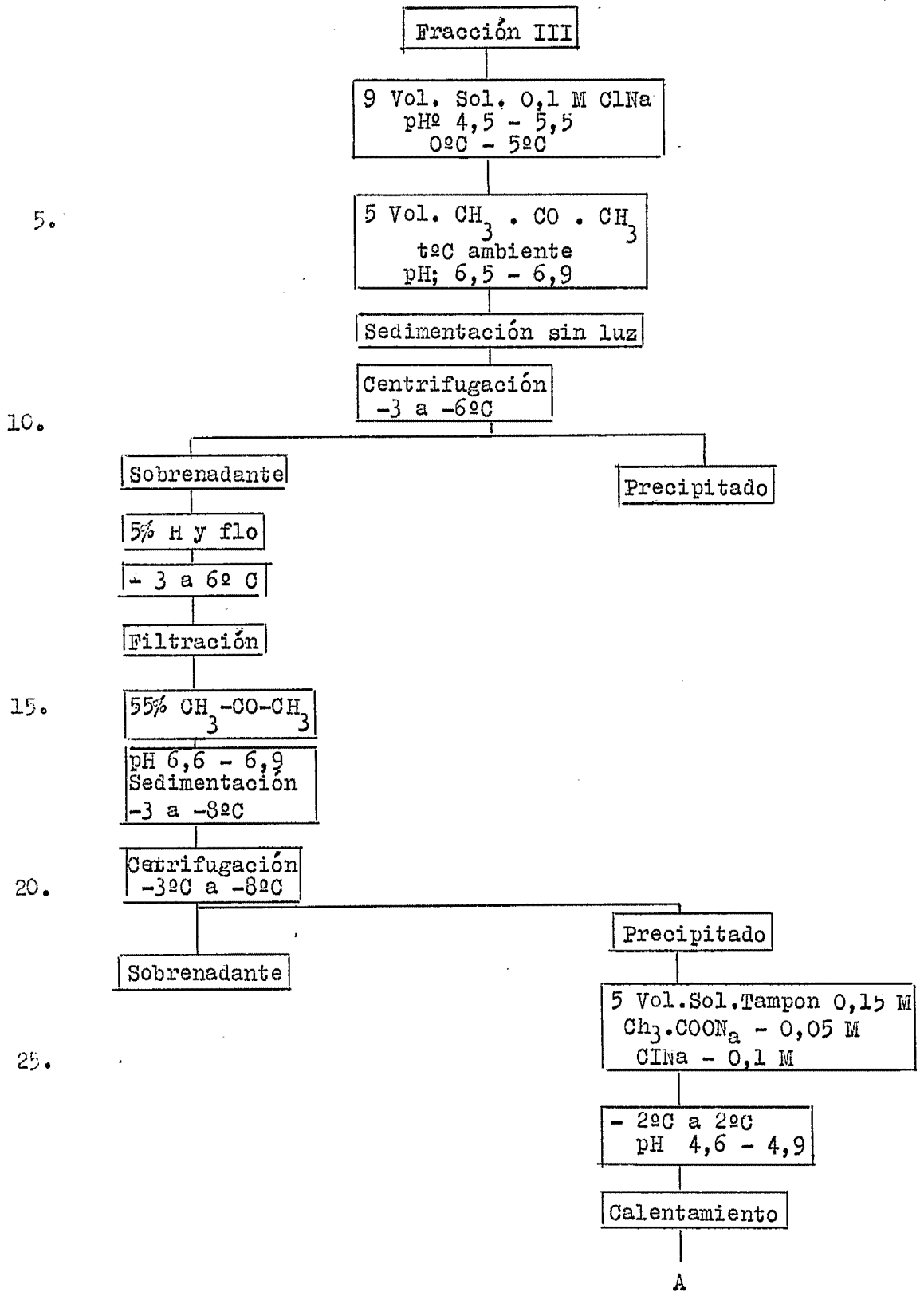
En todas las pruebas efectuadas, se ha partido de 1 Kg de fracción III obtenida por el método antes citado. Esta fracción se suspende en 10 volúmenes de agua estéril y apirógena de 0°C a 5°C y se agita hasta obtener una suspensión perfecta. A continuación se centrifuga desechando el sobrenadante que arrastra otras proteínas, quedándonos con el precipitado que llamaremos igualmente fracción III, y que es la fracción que contiene la ceruloplasmina. Esta fracción III es de color verde oscuro. - -

20. Esquemáticamente, a partir de aquí, podríamos representar el procedimiento así: - - - - -

25.

307095

14 DIC

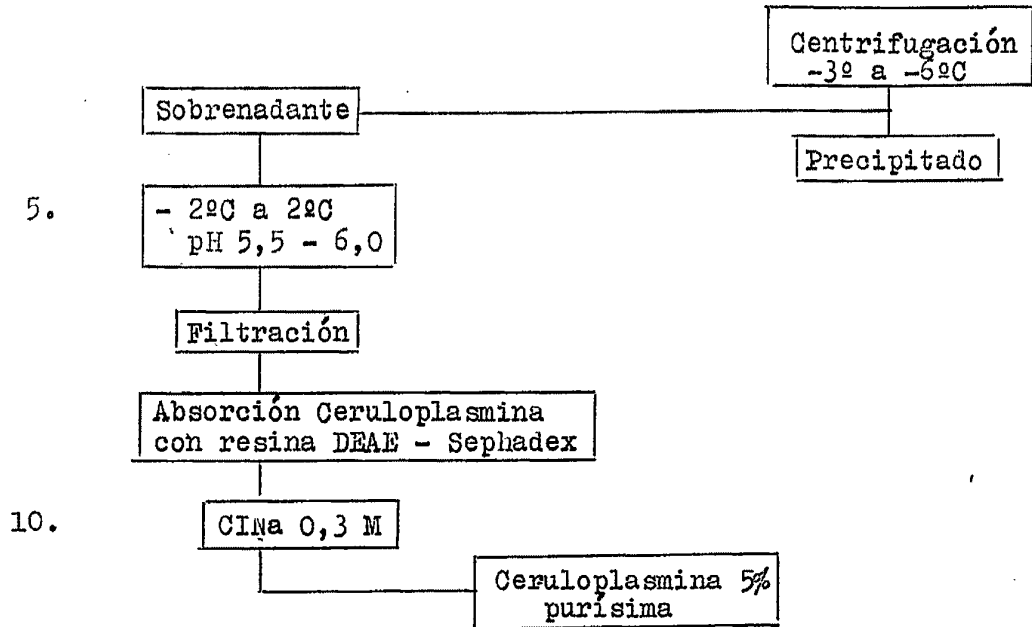


14 DIC



307095

A



15. Tratamos la fracción III con 9 volúmenes de solución de cloruro sódico 0,1 molar a pH comprendido entre 4,5 y 5,5 y temperatura entre los 0º C y los 5º C. En agitación se empiezan a adicionar 5 volúmenes de acetona. A medida que se añade la acetona, la temperatura debe ir aumentando hasta conseguir la temperatura ambiente. Acabada la adición se continúa agitando. Se neutraliza a un pH comprendido entre 6,5 y 6,9 con NaOH - N/10 y se deja en reposo en la oscuridad durante unas horas. - - - - -

25. Durante este período de reposo la ceruloplasmina es extraída de la fracción III, pasando el líquido sobrenadante. Transcurrido este tiempo, se coloca el recipiente a una temperatura entre los -3º C y los -6º C, en una cámara frigorífica. A esta temperatura se centrifuga. El líquido sobrenadante contiene la ceruloplasmina; el precipitado se desecha. Se añade un 5% de Hyflo al líquido sobrenadante y se agita filtrándolo a continuación entre los -3º C y los

14 DIC



307095

- 6°C; el líquido filtrado es completamente transparente. Se mide el volumen del líquido obtenido y se coloca en un recipiente provisto de agitador. Se calcula la cantidad de acetona que hemos de adicionar para llegar a una concentración del 55%. La acetona se añadirá sin sobrepasar los -8°C. Acabada la precipitación, se comprueba el pH, que deberá estar comprendido entre 6,5 y 6,9, neutralizando en el caso de no estar ajustado, con NaOH-N/10 o bien con ClH-N/10 y se deja a una temperatura comprendida entre los -3° y -8°C durante unas horas, guardando las precauciones anteriores. - - - - -

Transcurrido este tiempo se centrifuga a la misma temperatura recogiendo el precipitado que contiene la ceruloplasmina 2. El precipitado se conserva a -8°C. -

15. Se pesa dicho precipitado y se disuelve en 5 volúmenes de solución tampón 0,15 molar, en la proporción siguiente:

Acetato sódico.....0,05 M.

Cloruro sódico.....0,1 M.

20. todo ello entre la temperatura de t 2°C a -2°C. - - - -

Se baja el pH con ClH - N/10, entre 4,6 a 4,9. Se calienta al baño maría durante un periodo no superior a los 10 minutos y a una temperatura entre los 60°C y los 70°C. Durante el calentamiento aparecen copos blancos y la solución adquiere un color azul intenso desapareciendo el color verdoso que presentaba antes del ca-

- 25.

307095

14 DIC



- lentamiento. Después de este tratamiento se centrifuga procurando que la centrífuga esté de -3 a 6°C. El líquido después de centrifugado conteniendo la ceruloplasmina bastante purificada, se deja a una temperatura entre
- 5. t 2º a -2ºC. El filtrado se sigue manteniendo a la misma temperatura y se neutraliza con NaOH - N/10 a pH entre 5,5 y 6. La concentración de ceruloplasmina diluída y la purificación final la hacemos con resina DEAE-SEPHADEX, (dietilaminoetil), añadiéndola a la solución de ceruloplasmina, agitando continuamente. Toda la ceruloplasmina debe ser absorbida en esta operación. Se filtra por Buchner al vacío, lavando a continuación convenientemente la resina. Una vez que la resina está perfectamente escurrida, se calcula la cantidad de cloruro sódico que se necesitará para pasar la solución de ceruloplasmina absorbida por la resina (de 0,15 M a 0,3 M). Se añade el cloruro sódico agitando convenientemente. Se pasa la resina a un Buchner provisto de una placa filtrante para escurrir totalmente la ceruloplasmina, utilizando el vacío. La ceruloplasmina tarda en recogerse. El líquido, ceruloplasmina altamente purificada, tiene una concentración del 5% aproximadamente y es de color azul intenso. Se conserva en cámaras frigoríficas a 2ºC, sin sufrir ninguna alteración y responde a todos los controles analíticos especificados en la introducción. - - - - -
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.

Habiendo efectuado la descripción que antecede, debe hacerse constar que el objeto de la invención es el que se define en los términos de las reivindicaciones que siguen. - - - - -

14 DIC

307095



N O T A

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.- Procedimiento para la obtención y purificación de ceruloplasmina, a partir de fracciones plasmáticas, específicamente uno que parte de la fracción III, obtenida por fraccionamiento del plasma sanguíneo mediante el método preconizado por H.S. Nitschmann, P. Kistler y W. Lergier, caracterizado por el hecho de que una masa de dicha fracción III, que previamente se ha tratado con 10 volúmenes de agua estéril y apirógena a 0 - 5°C, se ha agitado hasta obtener una suspensión perfecta y se ha centrifugado desechando el sobrenadante, se trata el precipitado resultante contenedor de la ceruloplasmina, con 9 volúmenes de cloruro sódico 0,1 molar con un pH comprendido entre 4,5 y 5,5 y temperatura entre 0 y 5°C, se agita y se añaden 5 volúmenes de acetona aumentando la temperatura durante la adición de ésta hasta alcanzar la temperatura ambiente, tras lo cual se continúa la agitación, se neutraliza a un pH comprendido entre 6,5 y 6,9 y se deja en reposo en la oscuridad durante unas horas, para centrifugar seguidamente el líquido a una temperatura comprendida entre -3 y -6°C, desechando el precipitado y se añade un 5% de Hyflo al líquido sobrenadante, procediéndose a una agitación con filtrado también a la temperatura últimamente citada, se añade acetona hasta alcanzar una concentración del 55%, todo ello sin sobrepasar los -8°C y ajustando el pH entre 6,5 y 6,9

307095

14 DIC 19



- y se deja el líquido en reposo durante unas horas en la oscuridad, para centrifugar a la misma temperatura, recogiendo el precipitado que contiene la ceruloplasmina 2 y conservándolo a -8°C , tras lo cual se pesa
5. dicho precipitado y se disuelve en 5 volúmenes de solución tampón 0,15 molar a una temperatura comprendida entre $+ 2$ y -2°C , se baja el pH entre 4,5 y 4,9, se calienta al baño maría durante un período de tiempo no superior a los 10 minutos y a una temperatura comprendida
10. entre los 60 y 70°C , se centrifuga a una temperatura de -3 a -6°C , dejando el líquido a una temperatura comprendida entre $+ 2$ y -2°C , se filtra a la misma temperatura y se neutraliza a un pH comprendido entre 5,5 y 6, se añade a la solución, resina DEAE-SEPHADEX agitando
15. continuamente, con lo cual queda absorbida toda la ceruloplasmina, se filtra por Buchner al vacío lavando a continuación la resina y se añade, agitando cloruro sódico para pasar la solución de ceruloplasmina absorbida por la resina de 0,15 M a 0,3 M, se pasa la resina a
20. un Buchner provisto de placa filtrante para escurrir totalmente la ceruloplasmina, utilizando el vacío, con lo que se obtiene ceruloplasmina concentrada al 5% que se conserva a 2°C sin sufrir ninguna alteración. - - - -

25. 2.-"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION Y PURIFICACION DE CERULOPLASMINA A PARTIR DE FRACCIONES PLASMATICAS". - - - - -

Todo ello según se describe y reivindica en

307095

14 DIC



la presente memoria que consta de doce hojas, foliadas
y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID, 14 DIC. 1964

P.A.

M. CURELL SUÑOL