

328692



328692

MEMORIA DESCRIPTIVA

=====
Correspondiente a la solicitud de registro de una Patente de Invención que, por veinte años se solicita registrar en España, a favor de la firma EISAI CO., LTD, de nacionalidad jurídica japonesa, residente en TOKYO (Japón), 10, 6-ban, 4-chome, koishikawa, Bunkyo, -----

p o r

" PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA SOLUCION ACUOSA ESTABLE DE LISOZIMA "

=====
La presente invención se refiere al método de preparación de una solución acuosa de lisozima, y más particularmente comprende el medio de evitar que en ella se produzcan precipitados grumosos adicionándola una suficiente cantidad de un agente activo de superficie noniónico, que emulsionado o disuelto en
5 agua, produzca una concentración final de más del 0,0005 por ciento.

La lisozima es una proteína catiónica descubierta como enzima bacteriológica de la clara del huevo. Hidroliza el β (1-4)
10 de enlace entre el mucopolisacaride y el mucopeptide. También

328692



es conocida con el nombre de miramidasasa.

Este enzima se halla muy extendido no sólo en la clara de huevo, sino también en cuerpos fluidos, en los tejidos y órganos de animales y de seres humanos. Cuando la lisozima es administrada por via bucal o parenteral muestra un amplio grado de propiedades farmacológicas como antiedemático, antiinflamatorio y antivirulento, y tiene acción hemostática y de normalización de la flora anterítica. Por ello tiene mucha aplicación en usos terapéuticos.

No obstante ha habido dificultades para obtener preparaciones acuosas de lisozima o de sus sales, debido a que este enzima experimenta en dichas soluciones acuosas descomposición superficial al ser filtrado o agitado y en esas condiciones se precipita con pérdida de su actividad.

Teniendo en cuenta dichas circunstancias, si se consigue cambiar el estado físico de la superficie de la solución acuosa de lisozima podría ser evitada la precipitación causada por la descomposición iniciada, y los inventores han estudiado el método de suprimir la producción de dichos precipitados grumosos originados, según se ha dicho, por la descomposición de la superficie de tales soluciones acuosas de lisozima. Después de preparar varias soluciones acuosas de lisozima, se les agregaron diversos agentes activos de superficie en concentraciones diferentes y se observó en cada caso el grado de producción de precipitados grumosos como resultado de agitarlas (se empleó el agitador Iwaki), y se averiguó que los precipitados grumosos de la lisozima podrían ser evitados agregando a dicha solución acuosa de lisozima una muy pequeña cantidad de un agente activo de superficie de carácter non-iónico.

Se prepararon soluciones de ensayo agregando varios agente activos de superficie a diversas concentraciones de la formula básica

328692



de solución acuosa de lisozima que a continuación se escribe. Diez centimetro cubicos de cada una de las soluciones de ensayo fueron introducidos en respectivas ampollas de veinte centimetros cubicos de capacidad, y cada ampolla fue cerrada a la llama. Cada ampolla
 5 fué sacudida mecanicamente (360 veces por minuto con una amplitud de cinco centimetros, durante 24 horas) y se observó en cada ampolla la formación de precipitados grumosos. Los resultados están expuestos en la Tabla I.

La citada formula de base para estos ensayos es:

10	Cloruro de Lisozima	2,50 %
	Sorbitol	5,00 "
	Paraben metilo	0,13 "
	Paraben propilo y	0,02 "
	Agua destilada para completar las 100 partes.	

15 Tabla I

Experiencia nº	Agente superficial activo agregado		Concentración de la superfi- cie del agente activo		Formación de precipi- tado grumo so despues de agita- ción
		HLB			
20	1	ninguno	-	-	++
	2	Estearato -(10)-polioxietileno	10,8	0,1	+
	3	" -(25)- "	15,2	0,1	-
	4	" -(40)- "	17,4	0,1	-
	5	" -(45)- "	17,9	0,1	-
	6	" -(55)- "	19,1	0,1	-
25	7	Eter-(20)-polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado	9,2	0,1	-
	8	" " -(40)- "	12,3	0,1	-
	9	" " -(60)- "	14,1	1,0	-
	10	" " -(60)- "	14,1	0,5	-
30	11	" " " "	14,1	0,25	-

328692



	12	"	"	"	"	14,1	0,1	-
	13	"	"	"	"	14,1	0,05	-
	14	"	"	"	"	14,1	0,005	-
	15	"	"	"	"	14,1	0,0005	++
5	16	"	"	-(80)-	"		0,1	-
	17	"	"	-(100)-	"		0,1	-
	18	Monooleato sorbitan Polioxietileno				15,0	0,1	-
	19	Trioleato sorbitan polioxietileno				11,0	0,1	-
	20	Sulfato sodio lauril					0,1	+++
10	21	Cloruro benzetonio					0,1	✕
	22	Fenol nonil polioxietileno formaldehido condensado				13,2	0,1	+
	23	Ester ácido poliglicerol laúrico				16,2	0,1	-

Signos: +++ Gran cantidad de precipitado formado inmediatamente.

++ Gran cantidad de precipitado formado después de agitacion

15 + Dificil de observar la precipitación por no disolverse el agente activo por completo y haber nubes en el liquido

- No se observó precipitación.

✕ No se observó precipitación, pero la solución se hizo turbia.

20 En dicha Tabla L, la expresión HLB es abreviatura del agente activo de superficie Hidrofile-Lipofile-Balance, cuyas características pueden encontrarse en los siguientes escritos: W. C. Griffin: J.Sociedad de Cosmetica y Quimica. Volumen 1. pagina 311 (1949) y en Volumen 5, pág. 1 (1954).

25 El agente de superficie aniónico sulfato sódico lauril forma con liozima un compuesto insoluble. El agente activo de superficie catiónico cloruro de benzetonio se ha visto que es eficaz, pero tiene tendencia a producir una solución turbia, por lo que resulta poco aceptable para empleos farmacéuticos.

30 Siguiendo las investigaciones propias de esta invención, toda

328692



clase de agentes activos de superficie non-iónicos, que son emulsi-
vos o solubles en agua y que tienen valores HLB de diez o más, son
eficaces segun la definida concentración.

5 Agentes activos de superficie éteres alkil ó alkil aryl polioxi-
tileno, como el éter lauril -(25)- polioxietileno y el éter nonil
fenol -(20)- polioxietileno; ésteres ácidos grasos polioxietileno
como el estearato -(25)- polioxietileno; ésteres ácidos grasos sor-
bitan polioxietileno como el monooleato sorbitan polioxietileno;
10 condensados de alkil fenol formaldeido polioxietileno como el con-
densado nonil fenol formaldeido polioxietileno; alkil aminas polio-
xietileno como el amina lauril N,N -(20)- dipolioxietileno; alkil
amidas polioxietileno como el block polimeros N,N -dipolioxietileno
-(20)- lauril amida polioxietileno - polioxipropileno; éteres de
aceite de ricino/hidrogenado polioxietileno como el éter -(60)- acei-
15 te de ricino hidrogenado polioxietileno; ésteres ácidos grasos po-
liglicerol como el éster ácido lauric (HLB 16) poliglicerol, son
aplicables.

 Según las circunstancias de las experiencias mencionadas en la
Tabla I, un agente activo de superficie non-iónico con concentración
20 de 0,0005 % no es capaz de evitar la formación de precipitados de
lisozima descompuesta en una solución acuosa de dicha substancia,
y en efecto puede esperarse que se produzca. Por consiguiente, la
concentración de una non-iónica superficie del agente activo debe
ser superior al 0,0005 % (W/V), y los agente activos de superficie
25 non-iónicos con concentraciones comprendidas entre más de 0,005 %
y menos de 1,0 % (W/V) deben considerarse como adecuados para un
empleo práctico.

 La invención se refiere pues al procedimiento de obtención de
la solución acuosa de lisozima y ó de sus sales con la determinada
30 concentración, practicamente menor del diez por ciento (W/V). Los

328692



inventores han seguido investigando la influencia de las superficies activas de los agentes non-iónicos en la actividad de la lisozima. Asi, se ha determinado que cuando a la solución acuosa de lisozima se van agregando dichos agente non-iónicos en concentraciones comprendidas entre 0,001 y 10 por ciento, cuando la lisozima está en una relación del 2,5 %, dicha lisozima no pierde su actividad en cada caso. La actividad enzimática de la lisozima ha sido determinada mediante la medición de su acción bacteriológica en *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698.

A continuación se dan varios ejemplos de agregación de agentes activos capaces de evitar los precipitados grumosos.

Ejemplo 1º.:

	Cloruro de lisozima	2,5 %
	Sorbitol	5,0
15	Eter de aceite de ricino hidrogenado -(60)-polioxietileno	0,005
	Paraben metilo	0,13
	Paraben propilo	0,02
20	Agua destilada para completar el total de 100 partes.	

Una solución acuosa de esta formula fué filtrada en un dispositivo de retención de bacterias en condiciones asépticas. Una ampolla esterilizada, de dos centímetros cubicos de capacidad fué llena con dos centímetros cubicos de dicha solución y cerrada a la llama. Esta solución está prevista para inyecciones intramusculares.

Ejemplo 2º.:

	Cloruro de lisozima	2,5 %
	Sorbitol	5,0
30	Monooleato sorbitan-polioxietileno	0,1

328692

5



Paraben metilo 0,13
Paraben propilo 0,02
Agua destilada para
completar el total de 100 partes.

5 Una solución acuosa de esta formula fué filtrada en un dispositivo de retención de bacterias, en condiciones asépticas. Una ampolla esterilizada, de dos centímetros cúbicos de capacidad fué llenada con dos centímetros cúbicos de dicha solución y cerrada a la llama.

10 Esta solución está prevista para inyecciones intramusculares.

Ejemplo 3º.

Lisozima 2,5 %
Sorbitol 5,0
Estearato -(40)- polioxietileno 0,1
Paraben metilo 0,13
Paraben propilo 0,02
Agua destilada para
completar el total de 100 partes.

15

20 Una solución acuosa de esta formula fué filtrada en un dispositivo de retención de bacterias, en condiciones asépticas. Una ampolla esterilizada, de dos centímetros cúbicos de capacidad fué llenada con dos centímetros cubicos de dicha solución y cerrada a la llama.

Esta solución está prevista para inyecciones intramusculares.

25

Ejemplo 4º.

Lisozima 1,5 %
Glucosa 5,0
Eter de aceite de
ricino hidrogenado
-(40)-polioxietileno 0,25
Paraben metilo 0,13

30

328692



Paraben propilo 0,02
Agua destilada para com-
pletar el total de 100 partes.

5 Una preparación de esta formula fué filtrada en un dispositi-
vo de retención de bacterias, en condiciones asépticas. Una ampo-
lla esterilizada de cinco centímetros cúbicos de capacidad fué
llenada con cinco centímetros cúbicos de dicha preparación y cerra-
da a la llama.

N O T A

10 EN RESUMEN, la patente de invención que, por veinte años se
solicita registrar en España debiera recaer sobre las siguientes
reivindicaciones:

15 1ª.- Procedimiento de preparación de una solución acuosa esta-
ble de Lisozima y o de sus sales, caracterizado por evitar en él
la formación de precipitados grumosos mediante la agregación de
un non-iónico agente activo de superficie que se emulsione a di-
suelva en cantidad de agua suficiente para dar a la solución una
concentración final de más de cinco diezmilésimas por ciento.

20 2ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, carac-
terizado porque el agente non-iónico agregado es un derivado del
polioxietileno.

3ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, carac-
terizado porque el agente non-iónico agregado es un ácido graso
éster del poliglicerol.

25 4ª.- Por ultimo se reivindica como objeto sobre el que ha de
recaer la patente de invención que, por veinte años se solicita
para España, -----

p o r

" PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA SOLUCION ACUOSA ESTABLE
30 DE LISOZIMA "

328692



Todo conforme queda expresado en la presente Memoria Descrip-
tiva que consta de nueve hojas escritas a máquina por una sola
cara.

Madrid, 5 JUL. 1966

P.A.,

PEDRO FELIX MAÑA
P.P.