

400155

18 MA



Int. Cl.<sup>2</sup>: C12K, A61K

P.- 50.199

111/72

MEMORIA DESCRIPTIVA

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE _____
SUBCLASE _____

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

A nombre de INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RE  
CHERCHE MEDICALE

entidad francesa

establecida en 3, rue León Bonnat, París, Francia.

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE EMULSIONES LI  
PIDICAS ACTIVADAS"

(Clase Internacional C12k, A61k)

400 155



P.- 50.199

111-115/72

5

El invento tiene como objeto un procedimiento para la obtención de emulsiones lipídicas. Concierne igualmente a los productos así obtenidos, que pueden ser aplicados como reactivos en seroinmunología. Una aplicación particularmente interesante de dichos productos es la de permitir la puesta en evidencia de anticuerpos por aglutinación de la emulsión lipídica, especialmente los anticuerpos presentes en la sangre circulante y responsables de la hiperlipidemia.

Para ilustrar el invento, se indicará brevemente uno de sus campos de aplicación. Desde 1965 se sabe que la hiperlipidemia por autoanticuerpos es una enfermedad que desemboca frecuentemente en accidentes arteriales (aterosclerosis) y que es debida a la presencia en la sangre circulante de anticuerpos para la mayor parte de antilipoproteínas. Entre los documentos de la técnica anterior más representativos, se pueden citar a este respecto los artículos de J.L. BEAUMONT en "European Journal of Clinical and Biological Re --

400 155



rearch" (Hiperlipidemia autoinmune, una enfermedad me-  
tabólica aterogénica de origen inmune) y en "Atheros-  
clerosis : Proceedings of the Second International Sym-  
posium" (Hiperlipidemia autoinmune), Springer-Verlag,  
5 Nueva York 1970. Estos artículos contienen numerosas  
referencias bibliográficas que completan el estado do-  
cumental de la cuestión. En la presente descripción,  
el contenido de estas diversas referencias no será re-  
cordado en cuanto a los detalles y bastará referirse  
10 a ellas para situar de modo preciso el estado de la -  
técnica.

Evidentemente es muy importante poder detec-  
tar una enfermedad, tal como la hiperlipidemia por -  
autoanticuerpos, y de la manera más simple que sea --  
15 posible. No obstante, se ha encontrado que los anti--  
cuerpos responsables de la enfermedad no son casi nun-  
ca susceptibles de precipitar y generalmente muy poco  
susceptibles de aglutinarse, si bien que, incluso cuan-  
do se poseen el antígeno y los anticuerpos en estado  
20 puro, no se obtiene ninguna reacción susceptible de -  
detectarse por los procedimientos clásicos (precipita-  
ción en solución salina o en gel, aglutinación de he-  
matíes sensibilizados o de partículas de látex). Por  
lo tanto, se debe recurrir a otros medios de detección,  
25 que ponen en juego especialmente del fenómeno de aglu-

400 155



tinación de una emulsión lipídica.

Dicho fenómeno está caracterizado por la aglu-  
tinación visible a simple vista y al microscopio de --  
las partículas lipídicas de una emulsión en presencia  
5 de un suero o de una fracción de suero que contiene --  
un anticuerpo que reacciona con una sustancia (antíge-  
no) situada en la superficie de la emulsión. Este es  
específico y puede ser inhibido por un exceso de antí-  
geno. Este fenómeno se asemeja a los fenómenos de aglu-  
10 tinación de hematíes o de otras partículas (látex) ac-  
tivadas o no por otras sustancias que se utilizan nor-  
malmente hoy en día para el estudio de los anticuer--  
pos. Un fenómeno de floculación de emulsión lipídica  
ya se ha utilizado en serohematología para ciertos --  
15 ensayos, unos de naturaleza inmunológica (reacción de  
Wasserman), otros no específicos (ensayo con cefalino-  
colesterol).

En ciertos documentos de la técnica anterior,  
en particular en la patente inglesa 1.163.470, se ha  
20 propuesto utilizar un aceite seco, no tóxico para la  
producción de diversas vacunas. Estas vacunas están --  
constituídas por una dispersión de un material antíge-  
no en tal aceite, que puede ser especialmente un aceite  
vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete.  
25 Los productos así obtenidos son vacunas y no reactivos

400 155

18 MAR



utilizables para la detección de las reacciones de an  
tígeno-anticuerpos. Además, estas vacunas son produci  
das dispersando en el aceite los antígenos cuidadosa-  
mente desecados de modo previo. Por el contrario, se-  
5 gún el invento se propone un procedimiento para la ob-  
tención de emulsiones lipídicas activadas, en el cual  
se realiza una emulsión de aceite en agua, en cuya su  
perficie se encuentra el antígeno. La emulsión según  
el invento, que contiene por lo tanto un medio acuoso,  
10 no es utilizable como vacuna, sino en calidad de reac-  
tivo por aglutinación.

Para ilustrar la tecnología de aglutinación  
conocida en la técnica anterior con empleo de un lá-  
tex, puede citarse la solicitud de patente holandesa  
15 publicada bajo el número 65 04823. Este último documen-  
to concierne a un procedimiento para la preparación -  
de un reactivo para determinaciones inmunoquímicas, en  
el cual se trata con una proteína inerte a un soporte  
inerte constituido por látex o una suspensión de tal  
20 soporte inerte, después de lo cual se activa la pro-  
teína con un antígeno o con un anticuerpo. Este proce-  
dimiento pertenece a la técnica conocida para la detec  
ción de las reacciones de antígeno-anticuerpos. El pre  
cente invento propone también uno de tales tipos de -  
25 reactivos, pero la naturaleza del soporte sobre el cual

400 155



se fija el antígeno difiere fundamentalmente, dado que, en la técnica anterior, se hace uso de un látex, mientras que el invento prevé utilizar, en calidad de soporte, una emulsión de aceite en agua.

5                   En efecto, los reactivos clásicos útiles para la detección de diversos anticuerpos no son convenientes para ciertas aplicaciones, especialmente (1) aquellas en que los anticuerpos reaccionan con lugares que no están presentes en estos reactivos y (2) aquellas  
10                   llas en que los anticuerpos son muy poco susceptibles de aglutinarse, tal como ocurre con la hiperlipidemia. Por lo tanto es necesario poner a punto diversos nuevos reactivos, los cuales, según el invento, están --  
                    constituidos por una emulsión lipídica activada.

15                   Por lo tanto el invento tiene como objeto -- un procedimiento general para la obtención de emulsiones lipídicas activadas.

                    Otro objeto del invento es un procedimiento que conduce a emulsiones lipídicas activadas que --  
20                   difieren esencialmente en lo que se refiere al antígeno activador.

                    Igualmente, el invento tiene como objeto las emulsiones lipídicas activadas obtenidas por dicho --  
                    procedimiento.

25                   El invento tiene como otro objeto la aplica

400 155



ción de nuevas emulsiones lipídicas activadas a título de reactivos para aglutinación, utilizables en seroinmunología con vistas a la detección de anticuerpos. -

El invento tiene además como objeto los --  
5 reactivos para aglutinación de una emulsión lipídica, aplicados especialmente a la detección de los anticuerpos responsables de la hiperlipidemia por autoanticuerpos.

El invento tiene como otro de sus objetos -  
10 un procedimiento general para la detección de anticuerpos contra sustancias muy poco o nada hidrosolubles, es decir sustancias esencialmente lipófilas.

El invento tiene además como objeto un procedimiento que permite la detección de pequeñas moléculas de antígenos (haptenos) gracias a la utilización  
15 de emulsiones lipídicas activadas.

De una manera general el invento tiene como objeto un procedimiento para la obtención de emulsiones lipídicas activadas, que está caracterizado porque  
20 se forma una emulsión en un aceite neutro, líquido a la temperatura ambiente, con una proteína que comprende o constituye al menos un antígeno activador correspondiente al anticuerpo que ha de ser detectado.

En una forma de realización particular, el  
25 invento concierne a un procedimiento para la obtención

400 155



de emulsiones lipídicas activadas que está caracteri-  
zado porque se pone a una proteína, tal como la  $\beta$ -li-  
poproteína, la albúmina deslipidada, y las proteínas  
del suero normal, en íntimo contacto con un aceite --  
5 neutro líquido a la temperatura ambiente, y porque se  
forma una emulsión estable por sucesivas centrifugacio-  
nes y purificaciones.

En otro aspecto, el invento concierne a un  
procedimiento para la obtención de emulsiones lipídi-  
cas activadas que está caracterizado porque se pone a  
10 una proteína, sobre la cual se han fijado moléculas -  
susceptibles de ser reconocidas por anticuerpos especí-  
ficos, en íntimo contacto con un aceite neutro líqui-  
do a la temperatura ambiente y porque se forma una emul-  
15 sión estable por sucesivas centrifugaciones y purifi-  
caciones.

Las proteínas que sirven para fijar otras -  
moléculas son, por ejemplo, la beta-lipoproteína y la  
albúmina del suero. Se utiliza de modo ventajoso la -  
20 albúmina. A título de moléculas que pueden ser fija--  
das sobre las proteínas, se utilizan especialmente pe-  
queñas moléculas (haptenos). Seguidamente se darán nu-  
merosos ejemplos de éstas.

El procedimiento del invento será ilustrado  
25 con más detalle en la descripción que sigue:

400 155



I. Preparación de las proteínas.

Las proteínas representan un constituyente esencial de las nuevas emulsiones lipídicas. Gracias al procedimiento del invento, estas emulsiones son ac-  
5 tivadas por dichas proteínas. Se pueden obtener diver-  
sas emulsiones lipídicas activadas según el tipo de -  
proteína utilizada, es decir según el tipo del antígen-  
no activador. Esta característica presenta un interés  
particular para la detección de la hiperlipidemia por  
10 autoanticuerpos o de cualquier otra enfermedad que ha-  
ce entrar en juego un anticuerpo, produciéndose la --  
aglutinación con el reactivo cuando la emulsión con--  
tiene el antígeno o los antígenos correspondientes al  
anticuerpo en cuestión.

15 Las emulsiones lipídicas según el invento -  
son estabilizadas de este modo por la presencia en su  
superficie de proteínas que, al mismo tiempo, las ac-  
tivan haciéndolas reactivas con ciertos anticuerpos.  
Con estas emulsiones lipídicas activadas, es posible  
20 reconocer la presencia de anticuerpos que reaccionan  
con los lugares presentes sobre las proteínas utiliza-  
das para la activación.

Según el invento se pueden utilizar también,  
para la preparación de emulsiones lipídicas activadas,  
25 proteínas sobre las cuales son fijadas otras moléculas

400 155



susceptibles de ser reconocidas por anticuerpos especí-  
ficos. En este caso, la emulsión lipídica, activada y  
estabilizada por la proteína, es un reactivo utilizable  
para la detección de numerosas actividades de anticuer-  
5 pos dirigidas contra los lugares suministrados por las  
moléculas fijadas sobre la proteína (haptenos).

Seguidamente se describirá, a título de ejem-  
plo ilustrativo, la preparación de ciertas proteínas  
convenientes para la obtención de las emulsiones lipí-  
10 dicas activadas.

A.- Preparación de  $\beta$ -liporproteínas.

En una primera forma de realización, se par-  
te de  $\beta$  -lipoproteínas de origen humano o animal. Se  
15 describirá ahora con detalle la preparación de la  $\beta$ -  
lipoproteína humana. Se utiliza suero humano normal -  
(SHN) que se mezcla con un volumen igual de tampón de  
veronal de pH 5,5. Con una solución A de Michaelis --  
compuesta por 29,43 g de veronal sódico, 19,43 g de -  
20 acetato de sodio y de agua destilada (complemento has-  
ta 1 litro), se obtiene el tampón de veronal de pH 5,5  
mezclando 1 volumen de dicha solución A de Michaelis  
y 9 volúmenes de suero fisiológico que tiene conteni-  
dos ponderales de NaCl de 9 g o/oo y de  $N_3Na$  de 1 g -  
25 o/oo) ajustando el pH con HCl.

400 155



(1) Precipitación de la  $\beta$ -lipoproteína.

La mezcla de SHN - tampón de veronal de pH 5,5 es diluida 1/2 y se le añade un volumen igual de una solución precipitante. Por 1 volumen de dicha mezcla diluida a 1/2, se añade de este modo 1 volumen de una solución precipitante constituida por un volumen de una solución de  $MgCl_2$  con 50 g o/oo en peso y un volumen de una solución de heparina con 4 g o/oo en peso. Después de haber mezclado íntimamente, se deja reposar durante una noche a 4°C, se decanta, se desecha el líquido sobrenadante, luego se aísla y se lava el producto precipitado.

(2) Lavado del precipitado.

El lavado del precipitado se efectúa en varias etapas.

(a) Se lava con varias recogidas, por ejemplo tres veces, con la solución precipitante anteriormente descrita en (1). En cada uno de estos lavados, se vuelve a poner al precipitado en suspensión, se centrifuga y se desecha la solución de lavado para aislar el precipitado lavado.

(b) Se recoge el precipitado obtenido después de la etapa (a) con tampón de veronal de pH 5,5 precedentemente definido en (1), de manera que se obtenga

400 155



la disolución parcial del precipitado.

(c) Se realiza una nueva precipitación, volumen por volumen, con la solución precipitante.

(d) Se efectúan adicionalmente lavados, por ejemplo dos lavados, del precipitado obtenido en (c), con la ayuda de la solución precipitante, en las mismas condiciones que se describen en (a).

(e) Se disuelve el precipitado lavado obtenido en la etapa (d) en un tampón de veronal de pH 7,3. El tampón de veronal de pH 7,3 se obtiene mezclando 1 volumen de solución A de Michaelis definida en (1) con 9 volúmenes del suero fisiológico anteriormente descrito, y ajustando el pH con HCl. De este modo, al final de la etapa (e) se obtiene una solución de  $\beta$ -lipoproteína en dicho tampón.

(3) Purificación de la  $\beta$ -lipoproteína.

(a) Se dializa la solución de  $\beta$ -lipoproteína frente a tampón fosfato 0,05 M de pH 6,5. Los tampones de fosfato designados por la abreviatura  $\text{TPO}_4$ , corresponden a la fórmula  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  (peso molecular 137,99).

(b) Se hace pasar la solución sobre una columna de DEAE-celulosa (dietilaminoetil-celulosa) acondicionada en  $\text{TPO}_4$ , 0,05 M, de pH 6,5. La elución se

400 155



realiza con  $\text{TPO}_4$  0,05 M de pH 6,5 hasta la eliminación de las  $\gamma$ -globulinas (obtención de una DO desde 0 hasta 280 m $\mu$ ) y luego con  $\text{TPO}_4$  0,15 M de pH 6,5, lo cual conduce a la elución de la fracción de  $\beta$ -lipoproteína.

5 (c) Se dializa el máximo de la  $\beta$ -lipoproteína frente al suero fisiológico tal como se describe precedentemente.

Como consecuencia de estas diversas etapas, se obtiene la  $\beta$ -lipoproteína humana que puede ser conservada con facilidad a una temperatura de +4°C aproximadamente.

10

El modo operatorio anterior ha sido descrito con detalles partiendo del suero humano normal. Se puede reemplazar este último por suero animal, dependiendo de la aplicación prevista para la emulsión lipídica activada que se obtiene tal como se describirá seguidamente.

15

Además, se pueden aportar variantes en las diversas etapas precedentes. Estas han sido descritas con detalle arriba de manera que se las haga perfectamente reproducibles por un experto en la técnica. La única condición es la de que se obtenga finalmente una fracción de  $\beta$ -lipoproteínas purificadas. Los medios cromatográficos de purificación indicados anteriormente en (3) han proporcionado buenos resultados

20

25

400 155



en la práctica.

B. Preparación de albúmina deslipidada.

En otra forma de realización, se parte de al  
5 búmina de origen humano o animal. Se describirá ahora  
con detalles la preparación de albúmina deslipidada -  
humana, pero es evidente que se puede reemplazar a es  
ta última por un producto de origen animal, dependien  
do de la aplicación prevista para la emulsión lipídica  
10 ca activada que se obtendrá finalmente.

Se utiliza por ejemplo la albúmina humana -  
fracción V presentada en el mercado por la Sociedad -  
Calbiochem. Se realiza entonces la deslipidación de -  
dicha albúmina con éter ordinario. A este efecto, se  
15 dispone la albúmina en polvo en recipientes sumergidos  
en un baño de hielo a 0°C y se le añaden aproximada--  
mente 5 volúmenes de éter. Se agita enérgicamente va-  
rias veces, por ejemplo tres veces, dejando reposar -  
algunos instantes entre cada operación (tiempo de re-  
20 poso por ejemplo de 15 minutos). Se centrifuga y se -  
desecha el éter para separar el producto sólido. Este  
producto es recogido con éter, es agitado de nuevo co  
mo precedentemente, después de lo cual se centrifuga  
y se aísla la albúmina. La operación se puede repetir  
25 varias veces, tal como es clásico en las extracciones

400 155



con disolventes. Finalmente, se seca la albúmina en va  
cío, para obtener una albúmina deslipidada.

Se pueden aportar variantes de este modo --  
operatorio. Así se puede reemplazar el éter por otro  
5 disolvente o mezcla de disolventes, capaz de extraer  
los lípidos de la albúmina, tales como metilal, cloro-  
formo u otro disolvente.

10 C. Proteínas a título de agentes para fijar  
otras sustancias.

1) Con la beta-lipoproteína, se pueden fi-  
jar con facilidad sobre las emulsiones lipídicas hepa-  
rina así como otros mucopolisacáridos según una técni-  
ca que se describe seguidamente.

15 2) Con la albúmina las posibilidades son to-  
davía mayores que con la beta-lipoproteína. Sin inter-  
medio de ningún agente químico se puede obtener en --  
efecto la fijación sobre la albúmina de numerosas mo-  
léculas. Esta fijación es aumentada cuando la albúmina  
20 es previamente deslipidada según el procedimiento ya  
descrito en el párrafo B. Esta concierne a cuerpos muy  
variados:

a) Lípidos : de este modo se ha preparado y  
utilizado albúmina cargada con fosfolípidos (mezcla -  
25 de fosfolípidos, cefalina, lecitina, esfingomiolina).

400 155

18 MAR 1972



Se ha utilizado también albúmina cargada con ácidos -  
grasos (especialmente ácido oleico).

5 b) Vitaminas : albúmina cargada con vitamina  
A ha sido preparada y utilizada para la preparación -  
de emulsión lipídica activada de modo correspondiente.

c) Medicamentos, especialmente ácido acetil  
salicílico y un agente hipocolesterolémico.

10 d) Mucopolisacáridos y especialmente hepari  
na que puede ser fijada sobre las emulsiones por inter  
medio de albúmina, tal como lo es por intermedio de -  
la beta-lipoproteína.

15 La enumeración de estas sustancias concier  
ne a aquellas para las cuales se han realizado las ex  
periencias necesarias y evidentemente esta enumeración  
no es exhaustiva. Es cierto y evidente que el campo -  
de aplicación del procedimiento del invento es mucho  
más vasto.

20 Las duraciones y las temperaturas de incuba  
ción de los antígenos en contacto con las proteínas -  
de soporte tales como albúmina o beta-lipoproteínas -  
son susceptibles de modificaciones en función de la -  
naturaleza del antígeno que se ha de fijar, siendo la  
duración óptima de 24 a 48 horas a 4°C. Es posible re  
ducir esta duración aumentando la temperatura, e incu  
25 bando por ejemplo a 37°C.

400 155



A título de ejemplo, se describirá la preparación de  $\beta$ -lipoproteínas cargadas con heparina.

Preparación de  $\beta$ -lipoproteínas cargadas con heparina.

5

Se utilizan las  $\beta$ -lipoproteínas obtenidas y purificadas tal como se describe en A o por las variantes precedentemente indicadas.

10

A las  $\beta$ -lipoproteínas se añade un peso sensiblemente igual de heparina, por ejemplo la heparina Fournier para inyección intravenosa de 5.000 M/ml, y se mezcla cuidadosamente. Se utilizan, a título ilustrativo, 20 mg de  $\beta$ -lipoproteínas y 20 mg de heparina. Se hace incubar la mezcla durante un cierto tiempo (30 minutos) a +4°C y luego se filtra sobre una columna rellena con gel de dextrano que está presentado en el mercado por la sociedad Pharmacia Uppsala bajo la denominación "Sephadex G 200" de calidad especial para la filtración sobre gel. Se procede seguidamente a la elución en suero fisiológico y se recoge el máximo excluido de "Sephadex" antes citado, que corresponde a una fracción que tiene un volumen ligeramente superior al de la muestra depositada. Se obtienen de este modo las  $\beta$ -lipoproteínas cargadas con heparina -

15

20

25

17.2.72

400 155



Tal como en los casos precedentes, se pueden aportar variantes en el modo operatorio descrito, especialmente utilizando productos animales en lugar de productos humanos, o empleando otras especies o géneros de heparina, siendo la única finalidad a lograr el aislamiento de una fracción proteínica a base de -  
5           β -lipoproteínas cargadas con heparina fijada.

Se observará que la preparación de las emulsiones lipídicas activadas con las proteínas que contienen otras moléculas se efectúa según el mismo procedimiento que se describe para el caso general de la beta-lipoproteína o de la albúmina. Es suficiente preparar por medios particulares la proteína que sirve -  
10           como agente de fijación.

La fijación sobre la proteína de la molécula considerada puede efectuarse bien sea en medio acuoso cuando se trata de una sustancia hidrosoluble (por ejemplo heparina) bien sea en un sistema de dos fases cuando el producto es insoluble en agua. En este caso se utiliza una de las dos técnicas siguientes:  
15           

- contacto prolongado de la solución acuosa de proteína con el producto bajo forma seca,

- contacto prolongado de la proteína en solución acuosa con el producto solubilizado en otra -  
20           fase no miscible con agua. Este último procedimiento

400 155



es aplicable especialmente a la preparación de albúmi  
na cargada con lípidos (fosfolípidos, ácidos grasos,  
vitaminas liposolubles). Los disolventes utilizados -  
para la segunda fase han sido éter y cloroformo. Ade-  
5 más, se puede preparar albúmina cargada con ciertas -  
sustancias a partir del suero de seres humanos o ani-  
males que las han absorbido, estando implicada aquí -  
la función de transporte de la albúmina. Esto se ha -  
realizado por ejemplo para la albúmina cargada con un  
10 medicamento hipolipidémico.

Después de fijación, la solución de proteí-  
na es lavada bien sea por filtración sobre gel, bien  
sea por cromatografía, bien sea también por precipita  
ción salina.

15 Una vez lavadas y recogidas en solución fi-  
siológica, las proteínas cargadas con moléculas "coad  
yuvantes" o "asociadas" están dispuestas para la pre-  
paración de las emulsiones lipídicas activadas según  
el procedimiento general descrito.

20 D. Todavía en otro modo de realización, el  
suero humano o animal normal es utilizado tal como es  
tá para la obtención de emulsiones lipídicas activa-  
das.

25 Se va a describir ahora la preparación pro-  
piamente dicha de las emulsiones lipídicas activadas.

400 155



II. Obtención de las emulsiones lipídicas -  
activadas.

5 Para la obtención de la emulsión, se utiliza un aceite neutro líquido a la temperatura ambiente, de origen animal o vegetal. El aceite de oliva comercial proporciona buenos resultados prácticos y se encuentra fácilmente disponible.

10 De una manera general, la emulsión se prepara mezclando cantidades dosificadas de aciete y de proteína en solución acuosa fisiológica y sometiendo la mezcla a la acción de los ultrasonidos. Las cantidades relativas exactas de proteína y de aciete varían dependiendo del tipo de proteína y se pueden determinar por medio de ensayos preliminares. Ejemplos ilustrativos se dan seguidamente. En general, es conveniente utilizar concentraciones de proteínas superiores a 1500  $\gamma$ /ml con relación a la emulsión. Las cantidades inferiores a 1500  $\gamma$ /ml procuran un rendimiento mediocre y una conservación más difícil de las emulsiones.

15 Las cantidades óptimas de proteínas para la preparación de las emulsiones se sitúan en general dentro del margen de 2000 a 3000  $\gamma$ /ml, pero varían con el tipo de antígeno utilizado. Se pueden utilizar concentraciones superiores, siendo eliminado a continuación el antígeno en exceso en el curso del lavado sobre columna

20

25

400 155



na de "Sephadex" o de "Sepharose".

Después de pasada por ultrasonidos, la emul  
sión es generalmente estabilizada. No obstante, si -  
partículas de suspensión se separan ulteriormente del  
5 líquido durante la conservación, es suficiente someter  
a la emulsión a la acción de los ultrasonidos durante  
un tiempo breve justamente antes de la utilización.

La emulsión es purificada en general por me  
dio de lavados. Otro medio eficaz de purificación es  
10 la filtración sobre gel. La emulsión puede ser conser  
vada en un envase de plástico en presencia de un inhi  
bidor del crecimiento o desarrollo bacteriano. A títu  
lo de inhibidor, se prefiere la azida de sodio  $\text{NaN}_3$ .

Se pueden utilizar otros aditivos en la --  
15 emulsión. Así, la emulsión puede ser hecha más visi  
ble por medio de una coloración previa.

Se describirán ahora a título puramente ilus  
trativo modos particulares de preparación de las emul  
siones lipídicas activadas.

20

A. Mezcla de proteína y de aceite.

La tabla siguiente indica las proporciones  
relativas de proteína y de aceite de oliva que permi  
ten obtener prácticamente emulsiones lipídicas activa  
25 das convenientes para las necesidades del invento. No

400 155



obstante, uno se puede apartar ligeramente de los valores exactos indicados, especialmente haciendo variar la cantidad de aceite. Las proteínas de la tabla I han sido definidas en el párrafo I precedente.

5

Tabla I

	Proteínas	Aceite de oliva
	Cantidad	
Emulsión lipídica activada con las $\beta$ -lipoproteínas	1 ml a <del>77</del> 1500 $\gamma$ /ml	75 $\mu$ l
10 Emulsión lipídica activada con SHN (suero humano normal)	Suero humano normal puro (70.000 $\gamma$ /ml) Cantidad: 10 ml	25 $\mu$ l
Emulsión lipídica activada con albúmina deslipidada	Albúmina deslipidada <del>77</del> 2000 $\gamma$ /ml Cantidad = 1 ml	200 $\mu$ l
15 Emulsión lipídica activada con las $\beta$ -lipoproteínas cargadas con heparina.	máximo excluido en la filtración sobre "Sephadex G 200" que tiene un contenido de $\beta$ -lipoproteínas de 1500 $\gamma$ /ml Cantidad : 1 ml	75 $\mu$ l

20 B. Pasada por ultrasonidos y tratamiento complementario.

Se somete a la mezcla oleosa obtenida en el párrafo A precedente a la acción de los ultrasonidos. A este efecto se sumerge una sonda de ultrasonidos en el tubo que contiene la mezcla y se trata durante un tiempo proporcional al volumen de la mezcla, especial--

25

400 155



mente a razón de 1 minuto por ml de solución proteíni  
ca. Es preferible evitar la elevación de temperatura  
de la mezcla y se trabaja por lo tanto enfriando la  
pared exterior del tubo, por ejemplo sumergiéndola en  
5 un baño de hielo a 0°C. La acción de los ultrasonidos  
debe permitir romper todas las gotas de aceite.

Después del paso propiamente dicho por ul--  
trasonidos, se diluye la emulsión bien sea con un tam  
pón de fosfato bien sea con suero fisiológico. El tam  
10 pón de fosfato utilizado proporciona un pH de 7,3 y -  
presenta la composición siguiente:

	Fosfato monopotásico anhidro	4,39 g
	Fosfato disódico 12 H <sub>2</sub> O	42,20 g
	Agua destilada c.s. para 1 litro	
15	NaN <sub>3</sub>	1 g

Como precedentemente, el suero fisiológico  
contiene, por litro de agua destilada, 9 g de NaCl y  
1 g de NaN<sub>3</sub>.

Las emulsiones precedentes, diferentes de -  
20 la emulsión con albúmina deslipidada, son diluidas a  
1/2 con el tampón de fosfato antes descrito, diluido  
por su parte a 1/5 en agua destilada. La emulsión con  
albúmina deslipidada es únicamente diluida a 1/5 con  
suero fisiológico. En todos los casos, se añaden 0,5  
25 ml de agua destilada en la superficie, evitando su --  
mezclado con la fase emulsificada.

17.2.72

400 155



Se procede entonces a una incubación durante una decena de minutos a temperatura media, por ejemplo a la temperatura ambiente, o también en baño María a 37°C. Los elementos más gruesos flotan de modo espontáneo y son eliminados por decantación. En el caso, de la emulsión con  $\beta$ -heparina, que flota en la superficie, es necesario vigilar que no se desechen más que las gotitas de aceite sobrenadantes.

10 C. Lavados de la emulsión.

Se somete en primer lugar a la emulsión a un tratamiento preliminar, que permite eliminar las partículas gruesas de emulsión que han sido mal rotas con los ultrasonidos y que forman una película. A este efecto, se depositan en la superficie 0,5 ml de agua destilada y se centrifuga con pequeña velocidad (2500 vueltas/minuto durante un minuto). Se elimina entonces la película formada y se repite varias veces la operación. Después de haber desechado las películas, se conserva un producto subnadante que representa la emulsión útil y que es sometido al lavado propiamente dicho.

Se describirá ahora el lavado de las emulsiones con  $\beta$ -lipoproteínas, con suero humano normal y con  $\beta$ -heparina. Estas emulsiones, desembarazadas de su película sobrenadante son lavadas con el tampón de



fosfato de pH 7,3 definido anteriormente y utilizado en la dilución a 1/5. Las emulsiones son diluidas a 1/4 con el tampón y luego son centrifugadas con 10.000 vueltas/minuto bajo enfriamiento. La duración total de las centrifugaciones es de aproximadamente 5 minutos y no se sobrepasa la velocidad de 10.000 vueltas/minuto para evitar la aglutinación de las emulsiones y otros fenómenos secundarios. Después de cada centrifugación, se decanta y se recoge el producto sobrenadante; se diluye con el tampón de fosfato diluido a 1/5 y se homogeneiza por una nueva pasada breve por ultrasonidos. Se repite la operación 4 veces para las emulsiones con  $\beta$ -lipoproteínas y con suero humano normal y 5 veces para las emulsiones con  $\beta$ -lipoproteínas cargadas con heparina. Es necesario vigilar que las pasadas por ultrasonidos entre cada lavado sean breves (del orden de 10 segundos).

Se describiré ahora el lavado de las emulsiones con albúmina deslipidada. A este efecto, se somete a una filtración sobre gel a las emulsiones desembarazadas de su película y que han sido sometidas a una incubación durante 10 minutos. La filtración se realiza sobre columna rellena con "SEPHADEX G 200" para filtración sobre gel. Se efectúa la elución con suero fisiológico que responde a la definición antes citada y

400 155



se conserva la fracción excluida de la elución.

Después de los diversos lavados, es necesario eliminar de nuevo la película eventualmente formada. A este efecto, se puede trabajar de manera usual por centrifugaciones sucesivas, por ejemplo tres, durante un minuto con 2500 vueltas/minuto depositando en la superficie 0,5 ml de agua destilada. En una variante, se puede centrifugar en dos capas a velocidad más elevada, por ejemplo por centrifugación a 3500 vueltas/minuto durante 2 minutos, siendo de 5 minutos la duración total de la centrifugación. Estas operaciones son suprimidas para la emulsión con  $\beta$ -lipoproteínas cargadas con heparina dado que éstas flotan por si mismas en la superficie. A veces es necesario someter a ésta emulsión a la breve acción de los ultrasonidos antes de utilizarla.

Se citará finalmente una técnica simplificada de lavado de las emulsiones que han proporcionado igualmente buenos resultados en la práctica:

Después de pasada por ultrasonidos, la emulsión es desembarazada de las partículas gruesas de emulsión, que han sido mal rotas y forman una película, por medio de una centrifugación durante un minuto a 2500 vueltas/minuto.

El lavado propiamente dicho se efectúa so--

400 155



5 bre columna de "Sephadex" o de "Sepharose" (escogida en función de la naturaleza del antígeno) y acondicionada en tampón de fosfato de pH 7,3 0,075 M. Se recoge de este modo un máximo excluido que contiene la emulsión lipídica activada y lavada.

10 En la práctica, para eluir las columnas de "Sephadex" o de "Sepharose" que sirven para los lavados de las emulsiones, se utiliza un tampón de fosfato de pH 7,3 0,075 M o suero fisiológico. Es posible igualmente eluir estas columnas con tampón de tris(hidroximetil)-aminometano 0,1 M de pH entre 7 y 9, suero fisiológico de tampón pH 7 con tris(hidroximetil)aminometano, tampón de ácido bórico de pH 7,8, -  
15 tampón de veronal de pH 7, o cualquier otro tipo de tampón usual en las eluciones.

D. Acondicionamiento de la emulsión antes de utilización.

20 Es cómodo emplear emulsiones diluidas. Por ejemplo, después de los lavados del tipo descrito en el párrafo C precedente, se pueden diluir las emulsiones hasta 1/20 con ClNa (suero fisiológico al 1/5) o con un tampón de fosfato de pH 7,3 de molaridad fisiológica a 1/5. Se obtiene así una emulsión cuya transpa  
25 rencia es pequeña pero suficiente cuando se toma una

400 155



muestra de emulsión de aproximadamente 50  $\mu$ l.

La emulsión puede ser conservada en tubos o en saquitos de plástico, por ejemplo en tubos de poliestireno, a una temperatura de +4°C a 20°C. En el caso en que en la superficie se forme una película, es suficiente decantar la emulsión y desechar la película. Una pasada por ultrasonidos antes de la utilización no es necesaria, salvo para las emulsiones activadas con  $\beta$ -lipoproteínas cargadas con heparina. En este último caso, de cualquier manera, la acción de los ultrasonidos debe ser breve.

Las emulsiones lipídicas activadas son utilizables así en la práctica como reactivos para aglutinación. Las aplicaciones y la utilización de estas emulsiones se describirán ahora.

### III. Aplicaciones de las emulsiones lipídicas activadas.

Las emulsiones lipídicas activadas según el invento son utilizables para el estudio y para la puesta en evidencia de toda una serie de anticuerpos y de reacciones serológicas que no son revelados por los reactivos clásicos, especialmente por los hemáticos o las partículas de látex sensibilizadas. Las emulsiones lipídicas activadas son útiles por lo tanto para la de

400 155



tección de anticuerpos en numerosas enfermedades, particularmente en las hiperlipidemias por autoanticuerpos.

5 En las aplicaciones previstas por el invento, la sensibilidad de las emulsiones a la presencia de los anticuerpos es muy elevada. La especificidad de las reacciones es siempre controlable con facilidad. Además, se obtienen resultados perfectamente nítidos y reproducibles.

10 El procedimiento consiste de una manera general en poner en presencia cantidades muy pequeñas y sensiblemente iguales de una emulsión lipídica activa y del medio líquido que contiene los anticuerpos que han de ser puestos en evidencia.

15 Se darán ahora, a título de ejemplos ilustrativos, ciertos modos de realización de estos ensayos.

20 Las emulsiones lipídicas activadas son utilizadas después de haber sido lavadas y diluidas con el tampón de fosfato, diluido por su parte a 1/5 con agua destilada de la manera descrita en II.D precedentemente. Dispuestas en microtubos a razón de 50  $\mu$ l - aproximadamente, tales emulsiones proporcionan una opalescencia nítida pero débil.

25 Con vistas a los ensayos, se disponen 50  $\mu$ l

400 155



de emulsión activada con antígenos en el fondo de los tubos y se añaden 50  $\mu$ l de un medio líquido a base de suero fisiológico que contiene los anticuerpos a estudiar bajo forma de dilución seriada.

5                    Se incuban entonces los tubos durante 1 hora a 37°C y luego durante 1 hora a + 4°C. Se centrifugan seguidamente los tubos hasta una velocidad máxima muy elevada de 18.000 vueltas/minuto durante un corto instante y se efectúa la lectura a simple vista o con el  
10                    microscopio.

                    En una variante, se incuba durante una noche a +4°C sin someter a los tubos a una centrifugación subsiguiente. Por ser estables las emulsiones, los resultados pueden ser leídos ulteriormente sin cambio.

15                    La lectura de los tubos a simple vista se efectúa por transparencia. Los testigos negativos son lechosos y homogéneos. Las reacciones positivas se manifiestan cuando el tubo se vuelve perfectamente límpido o transparente y presenta en la superficie una  
20                    película aglutinada.

                    Para la lectura con el microscopio, se retira la película aglutinada formada en la superficie de los tubos y se la observa por microscopio con contraste de fases disponiéndola entre plaquita y portaobjetos.  
25                    Los testigos negativos muestran pequeñas bolitas libres

400 155

18M



y móviles. Los ensayos positivos muestran productos aglutinados más o menos gruesos. La lectura consiste por lo tanto en observar los productos aglutinados y la disminución más o menos completa de las bolitas  
5 libres. En general esta lectura es muy nítida.

En la aplicación del invento a los ensayos de inhibición de la reacción de antígeno-anticuerpos, se puede proceder del siguiente modo: Se mezclan primeramente 50  $\mu$ l de un medio líquido a base de suero fisiológico que contiene el anticuerpo o los anticuerpos y 50  $\mu$ l de un mismo medio que contiene el antígeno inhi**bi**dir. Después de haber agitado esta mezcla, se incuba durante 2 horas a +4°C. En una segunda etapa, se añaden 100  $\mu$ l de emulsión activada, se agita -  
10 débilmente y se incuba durante una noche a +4°C. La -  
15 lectura se efectúa como anteriormente.

Finalmente se indicará una técnica simplificada de lectura, que es utilizable de igual modo en -  
los ensayos.

20 Sobre una lámina de vidrio se dispone una -  
gota de suero o de fracción a ensayar. Se añade seguidamente una gota de emulsión lipídica activada, y se mezcla con la ayuda de un agitador.

Se observa inmediatamente una reacción ma--  
25 croscopica. Un resultado positivo se traduce por una

400 155



aglutinación de forma cualquiera de las partículas lipídicas activadas. Un resultado negativo se traduce - por una ausencia de aglutinación.

5 El invento no está limitado a los modos específicos de realización anteriores, los cuales no han sido dados más que a título puramente ilustrativo. - Así, el procedimiento del invento es aplicable para - la detección no solamente de la hiperlipidemia por -- autoanticuerpos, sino también de anticuerpos activos  
10 contra los antígenos de emulsiones lipídicas que comprenden sustancias no hidrosolubles. De este modo se puede detectar un gran número de anticuerpos por fijación de antígenos insolubles en agua, directamente o por intermedio de proteínas. El procedimiento del invento es utilizable igualmente para el estudio de los  
15 anticuerpos naturales poco o nada precipitables. Una aplicación interesante del invento consiste también - en un procedimiento de valoración de los anticuerpos puestos en juego.

20 A título ilustrativo, se darán ahora otros ejemplos de preparación de emulsiones lipídicas, con el fin de mostrar la generalidad de aplicación del - procedimiento del invento. Los modos de preparación - seguidamente indicados están basados en el modo operativo general más arriba descrito.  
25

400 155



(1) Emulsión lipídica activada por alfa-lipoproteínas.

La preparación y la purificación de alfa-lipoproteínas a partir de suero humano normal se han efectuado según la técnica descrita en el artículo --  
5 "Purification de l'alpha-1-lipoprotéine du sérum" (Purificación de la alfa-1-lipoproteína del suero), de J. L. BEAUMONT y N. LEMORT, annales de Biologie Clinique, 1.969, 27, (237-245).

10 Para la preparación de la emulsión se utiliza:  
za:

- la solución de alfa-lipoproteínas purificada a una concentración próxima a 3.000  $\gamma$ /ml y aceite de oliva a razón de 0,1 ml/ml de solución de alfa-lipoproteína.  
15

Se hace pasar la mezcla por ultrasonidos durante 1 minuto por ml, lo cual proporciona una emulsión no lavada de alfa-lipoproteínas.

20 (2) Emulsión lipídica activada con ácido desoxirribonucleico (ADN).

Se utiliza una solución de ácido desoxirribonucleico comercial con una concentración próxima a 3000  $\gamma$ /ml.

25 Se efectúa una incubación previa del ADN -

400 155



con albúmina humana deslipídada con una concentración de aproximadamente 2000  $\gamma$ /ml en solución en un tampón de pH y de molaridad fisiológicas. La incubación durante 24 a 48 horas tiene lugar a +4°C.

5

Preparación de la emulsión

Se añaden 0,1 ml de aceite de oliva a la mezcla de ADN y albúmina.

10 Se hace pasar la mezcla por ultrasonidos durante 1 minuto por ml de solución, lo cual proporciona una emulsión lipídica activada con ADN, no lavada.

15

(3) Emulsión lipídica activada con estreptolisina.

Incubación previa:

20 Una solución de estreptolisina purificada del comercio con una concentración próxima a 3.000  $\gamma$ /ml es incubada con una solución de beta-lipoproteínas con aproximadamente 2.0000  $\gamma$ /ml, durante 24 a 48 horas a + 4°C.

Preparación de la emulsión

25 A la solución de estreptolisina + beta-lipo proteína después de incubación, se añaden 0,1 ml de -

400 155



aceite de oliva/ml de solución.

Se hace pasar la mezcla por ultrasonidos durante un minuto por ml de solución lo cual proporciona una emulsión lipídica activada con estreptolisina, no lavada.

(4) Emulsión lipídica activada con gamma-globulinas:

A una solución de gamma-globulinas del comercio que tiene una concentración próxima a 3000  $\gamma$ /ml, se añade aceite de oliva a razón de 0,1 ml/ml de solución.

Se hace pasar la mezcla por ultrasonidos durante 1 minuto por ml, lo cual proporciona una emulsión lipídica activada con gamma-globulinas.

Lavado de las emulsiones lipídicas (1) a - (4).

- después de pasada por ultrasonidos, las emulsiones son sometidas a una incubación durante 10 minutos a 37°C.

- se centrifuga con 2000 vueltas/minuto durante 1 minuto, para desembarazarlas de las partículas más gruesas y se desecha la película superficial.

- la porción subnadante es lavada, bien sea

400 155



por centrifugación, bien sea por filtración sobre --  
una columna de "Séphadex G 200" o de "Sépharose", --  
eluida con tampón de fosfato de pH 7,3 0,075 M o sue-  
ro fisiológico.

5

(5) Emulsión lipídica activada con antígenos de tejidos orgánicos.

Después de retirada de un órgano, se efectúa una perfusión con suero fisiológico para eliminar  
10 la sangre del animal. Se tritura seguidamente un fragmento de órgano (hígado) en suero fisiológico a 0°C y se centrifuga. Se recoge la porción sobrenadante, que se filtra sobre filtro Durieux, lo cual proporciona un líquido espeso y muy concentrado en proteínas. Se  
15 efectúa la preparación de emulsión lipídica con este filtrado. Se obtiene una emulsión añadiendo 0,1 ml de aceite a 1 ml de filtrado. La concentración óptima del filtrado está situada alrededor de 15 mg/ml. Se  
20 puede obtener una emulsión a partir de una concentración de 5 mg de proteínas/ml. La concentración de la emulsión recogida aumenta con la concentración del producto triturado. Con 40 mg/ml se obtiene una emulsión muy concentrada.

La pasada por ultrasonidos es, igual que --  
25 para las otras preparaciones, de 1 minuto por ml de --



solución que ha de ser emulsionada.

La incubación y el lavado sobre columna se efectúan igualmente de la misma manera.

5 Los ejemplos suplementarios (1) a (5) que -  
acaban de ser descritos pueden ser modificados tam-  
bién conforme a las indicaciones generales de la des-  
cripción. A título ilustrativo, es igualmente posible  
preparar las emulsiones activadas con estreptolisina,  
sin incubación previa con beta-lipoproteína.

10 Igualmente, se pueden preparar emulsiones -  
con gamma-globulinas después de incubación en presen-  
cia de albúmina; la albúmina y la beta-lipoproteína -  
desempeñan entonces el papel de soporte para la fija-  
ción de los antígenos sobre la emulsión.

15 El procedimiento anterior puede ser aplicado  
a la preparación de emulsiones activadas con antígenos  
extraídos de tumores benignos o malignos.

Es igualmente posible activar emulsiones -  
con antígenos de origen viral.

20 Es importante hacer observar la función par-  
ticular que es desempeñada por una proteína, tal como  
la albúmina, en el procedimiento del invento. Según -  
el invento, la albúmina es utilizada por sí misma co-  
mo antígeno o como soporte de un antígeno, gracias a  
25 su capacidad de fijar haptenos que no podrían ser in-

400 155



5       tegrados en la emulsión sin intermedio suyo. En un --  
procedimiento anterior conocido, tal como el procedi-  
miento con látex descrito en la solicitud de patente  
holandesa publicada bajo el número 65 04 823, la albú  
mina que se emplea es utilizada para neutralizar el -  
soporte inerte, que consiste en un látex.

10       El invento puede ser mejorado también en el  
campo de la lectura sin que éstos perfeccionamientos  
o mejoras salgan de su marco. Así, la lectura puede -  
ser sensibilizada por la utilización de un suero anti  
anticuerpos. La lectura puede ser hecha automática --  
gracias al empleo de un contador de partículas.

15       Todas estas variantes entran dentro del mar  
co del invento tal como se define por las reivindica-  
ciones anejas.

400 155



5

- REIVINDICACIONES -

10

1.- Procedimiento para la obtención de emul  
siones lipídicas activadas, utilizables a título de -  
reactivos para la puesta en evidencia de anticuerpos,  
estando caracterizado dicho procedimiento porque se -  
forma una emulsión en un aceite neutro, líquido a la  
15 temperatura ambiente, con una proteína que comprende  
o constituye al menos un antígeno activador que corres  
ponde al anticuerpo a detectar.

15

20

2.- Procedimiento según la reivindicación 1,  
caracterizado porque se pone a una proteína, tal como  
la  $\beta$ -lipoproteína, la  $\alpha$ -lipoproteína, la albúmina -  
deslipidada, la estreptolisina, las gamma-globulinas,  
las proteínas que provienen de extractos de tejidos or  
gánicos o las proteínas del suero normal, en íntimo -  
contacto con un aceite neutro líquido a la temperatura  
25 ambiente, y porque se forma una emulsión estable por

25

17.2.72

400 155



tratamiento con ultrasonidos, centrifugaciones y purificaciones sucesivas.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se pone a una proteína, sobre la cual se han fijado moléculas susceptibles de ser reconocidas por anticuerpos específicos, en íntimo contacto con un aceite neutro líquido a la temperatura ambiente y porque se forma una emulsión estable por tratamiento con ultrasonidos, centrifugaciones y purificaciones sucesivas.

4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se utilizan proteínas de origen humano o animal.

5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se utilizan  $\beta$ -lipoproteínas que provienen del suero y purificadas por cromatografía sobre columna y elución correspondiente con ayuda de tampones de fosfato.

6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se utilizan moléculas de albúmina que han sido sometidas a un tratamiento deslipidante con un disolvente tal como éter ordinario.

7.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se utilizan  $\beta$ -lipoproteínas



o albúmina deslipidada sobre la cual son fijadas otras moléculas (haptenos) que corresponden al anticuerpo - que se ha de detectar.

5 8.- Procedimiento según una cualquiera de - las reivindicaciones 3 y 7, caracterizado porque se - utilizan moléculas escogidas entre los lípidos, los - fosfolípidos y sus mezclas, la cefalina, la lecitina, la esfingomielina, o los ácidos grasos, comprendido - en ellos el ácido oleico.

10 9.- Procedimiento según una cualquiera de - las reivindicaciones 3 ó 7, caracterizado porque las moléculas fijadas son vitaminas, comprendida en ellas la vitama A, fijadas especialmente sobre la albúmina deslipidada.

15 10.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 7, caracterizado porque sobre la albúmina deslipidada, son fijados medicamentos, es pecialmente ácido acetilsalicílico o un agente hipoco lesterolémico.

20 11.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 7, caracterizado porque las moléculas fijadas son mucopolisacáridos, tales como - heparina.

25 *Re* 12.- Procedimiento según las reivindicacio- nes 3 ó 7, caracterizado porque se fija ácido desoxi-

400 155



rribonucleico (ADN), estreptolisina, gamma-globulinas, antígenos extraídos de tumores benignos o malignos, o antígenos de origen viral sobre la proteína que debe ser puesta en emulsión.

5                   13.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se utilizan moléculas hidrosolubles, tales como heparina, en cuyo caso la fijación sobre la proteína se realiza por puesta en íntimo contacto de la proteína en medio acuoso con dichas moléculas.

10

14.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se utilizan moléculas insolubles en agua, en cuyo caso se realiza la fijación por contacto prolongado de una solución acuosa de proteína con el producto a fijar utilizado en forma seca.

15

15.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se utilizan moléculas insolubles en agua, en cuyo caso se realiza la fijación por contacto prolongado de una solución acuosa de proteína con una solución del producto a fijar en una fase no miscible con agua.

20

*kg*

16.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado porque, después de puesta en contacto de la proteína y de las moléculas a fijar, la solución de proteína es lavada

25



por filtración sobre gel, cromatografía o precipitación salina, y luego es recogida en solución fisiológica, estando entonces las proteínas sobre las cuales se han fijado dichas moléculas, dispuestas para la preparación de las emulsiones lipídicas activadas.

5 17.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque se utiliza directamente suero o albúmina que proviene de dicho suero.

10 18.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza un aceite de origen animal o vegetal, tal como aceite de oliva.

15 19.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se mezclan cantidades dosificadas de aceite y de proteína en solución fisiológica y porque se somete a la mezcla a la acción de los ultrasonidos, siendo la concentración de proteínas en la emulsión especialmente superior a 1500  $\gamma$ /ml con relación a la emulsión, y estando comprendida en particular en el margen de 2000 a 3000  $\gamma$ /ml.

20 20.- Procedimiento según la reivindicación 19, caracterizado porque se purifica la emulsión por lavados o por filtración sobre gel.

25 21.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se acondiciona la emulsión li

400 155

28 JUN. 1974



pídica en envases de plástico conservados entre + 4°C  
y 20°C.

22º.- Procedimiento para la obtención de emul-  
siones lipídicas activadas.

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-  
tecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de cuarenta y cuatro hojas  
escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 28 JUN. 1974  
P.A.

*De*

Alberto de Eizaburo  
For Fedas

26.6.74  
MP/RTA