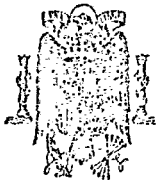


MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

28 SET. 1977

PATENTE DE INVENCION

11	NUMERO	446,334
21		
22	FECHA DE PRESENTACION	24-3-76

10 A1



30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	501.409		24-3-75		USA
	397.116		18-7-75		USA
	658.200		17-2-76		USA

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			AG1K		

64	TITULO DE LA INVENCION
UN METODO PARA LA PREPARACION DE PREALBUMINA DE SUERO HUMANO.	

71	SOLICITANTE (S)
SYNTEX (U.S.A.) INC.	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE	

72	INVENTOR (ES)
ABRAHAM WHITE y PAMELA M. BURTON, el primero estadounidense y el segundo británico, los cuales han cedido sus derechos a la Compañía solicitante	

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.	

P.D.

UNE A - 4 MOD. 3106

UTILICESE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

POOR
QUALITY



1 sable de eso tiene un peso molecular de aproximadamente
1000 daltones.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con los
métodos y composiciones farmacéuticas útiles para incremen-
tar la capacidad inmunológica.

10 En las solicitudes norteamericanas, Expedien-
tes Nos. 561.409 y 597.116 describimos el aislamiento y ca-
racterización de una proteína que tiene propiedades semejar-
tes a las de la hormona del timo de incrementar la capaci-
dad inmunológica. Esta proteína se describió como de un pe-
so molecular de aproximadamente 56700 daltones teniendo la
proporción de aminoácidos aproximada siguiente:

	<u>AMINOACIDO</u>	<u>% MOLECULAR</u>
15	Acido aspártico	6,6
	Treonina	9,5
	Serina	9,3
	Acido glutámico	10,3
	Prolina	6,6
20	Glicina	8,3
	Alanina	9,7
	1/2 Cistina	0,9
	Valina	9,5
	Metionina	0,7
25	Isoleucina	4,0
	Leucina	5,9
	Tirosina	2,3
	Fenilalanina	3,9
	Triptofano	1,0
30	Iisina	6,3



UNA 375

1

5

10

15

20

25

30

<u>AMINOACIDO</u>	<u>% MOLECULAR</u>
Histidina	3,1
Arginina	3,2

teniendo glicina e histidina como N-aminoácidos terminales; y un punto isoeléctrico de aproximadamente 5,0 (ahora determinado como de aproximadamente 4,5); y componiéndose de cuatro sub-unidades.

Se ha encontrado ahora que nuestra proteína descrita previamente es idéntica a la prealbúmina del suero humano, una proteína que existe en forma natural en el suero humano, la cual ha sido aislada, purificada e identificada previamente por secuencia de aminoácidos. (Ver Kauda, Y., J. Biol. Chem. 249, 6796-6805, 1974).

La identificación de la presente proteína, como prealbúmina humana fue hecha por una comparación de sus propiedades físicas y químicas con una muestra comercialmente disponible y por reactividad opuesta con los anticuerpos de prealbúmina humana.

Aún cuando la prealbúmina humana ha sido descrita previamente, se ha considerado que actúa simplemente como un vehículo específico para varias moléculas seleccionadas más pequeñas y no se ha reconocido que exhiba alguna actividad biológica intrínseca. Hemos descubierto, sorprendentemente que la prealbúmina humana tiene potentes propiedades semejantes a la de la hormona tímica de incrementar la capacidad inmunológica. El examen de muestras comerciales de prealbúmina humana en bioensayos seleccionados, según se describe después, muestra verdaderamente que estos materiales poseen la actividad biológica mencionada anteriormente, hasta ahora no reconocida.



1

De acuerdo con esto, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para incrementar la capacidad inmunológica por administración de una cantidad efectiva de prealbúmina del suero humano a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

5

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a las composiciones farmacéuticas útiles para incrementar la capacidad inmunológica que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de prealbúmina del suero humano en mezcla con un vehículo no tóxico, farmacéuticamente aceptable.

10

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a los métodos de aislamiento y purificación de la prealbúmina del suero humano de la fracción Cohn IV-I de sangre humana.

15

Según se usa en la especificación y reivindicaciones finales la expresión "capacidad inmunológica" se refiere al grado de respuesta de aquellos mecanismos fisiológicos que comprende la inmunidad. La inmunidad dota al paciente de la capacidad para neutralizar, eliminar o metabolizar materiales extraños, v.g., bacterias, virus y hongos, así como también células de otras especies animales sin afectar al paciente.

20

Esta expresión es bien conocida y aceptada en la inmunología como se ilustra, por ejemplo, en Bellanti, G. A., "Immunology", W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa., 1971. Se reconocen dos tipos extensos de inmunidad, a saber, inmunidad humoral, basada en la producción de anticuerpos circulantes, solubles, e inmunidad mediante células basada en la producción y funcionamiento de tipos específicos.

25

30



1 cos de células linfoides, (linfocitos). Los linfocitos ma-
duros participan en la inmunidad humoral y en la inmunidad
mediante células (Ver, Gell, P. G. H. y Coombs, P.R.A.,
5 Clinical Aspects of Immunology, 2nd Ed., F. A. Davis Co.,
Philadelphia, 1968; Miller J. F. A. P. and Osaba, D., Phy-
siological Reviews, 47: 137, 1967; Trainin, N., Physiologi-
cal. Reviews, 54: 272, 1974; White A., Ann. N. Y. Acad. Sci.,
29, 253, 1975).

10 Aún cuando no se pretende sujetarse a ningún
mecanismo de acción, se cree que el presente material ac-
túa incrementando el número y velocidad de maduración de
linfocitos capaces inmunológicamente a partir de células
precursoras incapaces.

15 El mejoramiento de la capacidad inmunológica
puede demostrarse por varios indicios que se utilizan in vi-
tro y bioensayos de animales pequeños in vivo bien conoci-
dos en la inmunología. Por ejemplo, se pueden mencionar es-
pecíficamente los siguientes ensayos:

- 20 1. Ensayo de roseta sensible a la azatioprina in vi-
tro (ensayo de roseta in vitro).
2. Ensayo de roseta sensible a la azatioprina in vi-
vo.
3. Síntesis de anticuerpos in vivo
4. Síntesis de anticuerpos in vitro.
- 25 5. Proliferación de tejido linfoide.
6. Reacción de linfocitos mezclados.
7. Blastogénesis concanvalina A.
8. Ensayo de roseta espontáneo in vitro.
9. Producción de linfocitos citotóxicos.
- 30 10. Autosensibilización de linfocitos in vitro.



1 11. Autosensibilización de linfocitos in vivo.

5 Hemos utilizado cada uno de los bioensayos anteriores para demostrar el mejoramiento de la capacidad inmunológica mediante la prealbúmina humana, como se detalla en los ejemplos.

Los ensayos mencionados anteriormente se refieren a una o más de las clases generales siguientes de significado clínico, para los cuales se cree que la capacidad inmunológica sea un factor:

- 10 estimulación de síntesis de anticuerpos (especialmente los ensayos 3 y 4);
sustitución y terapia de restauración (especialmente los ensayos 5-9);
15 enfermedades de autoinmunidad (especialmente los ensayos 10 y 11).

El ensayo de selección para una indicación rápida y exacta de la actividad para incrementar la capacidad inmunológica es el bien conocido ensayo de roseta in vitro, mencionado anteriormente según se describe por Bach, 20 J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 68, p. 2334 (1971), donde se mide la sensibilidad de las células de roseta formadas en el bazo a la azatioprina [6-(1-metil-4-nitro-5-imidazolil)mercaptopurina].

25 Este ensayo muestra buena correlación con el número de linfocitos de la clase T capaces inmunológicamente. En esta clase de linfocitos la que está involucrada en el funcionamiento conjuntamente con los linfocitos B en la síntesis de anticuerpos y que son las células principales que regulan la inmunidad mediante células. Un gran volumen 30 de evidencia sostiene el significado de este ensayo para



1 asegurar el estado inmunológico (referencia, Bach, J. F.,
"The Mode of Action of Immunosuppressive Agents", North
Holland American Elsevier Publishing Co., Amsterdam/New
York, 1975).

5 De acuerdo con esto, la prealbúmina humana
puede ser útil clínicamente para el tratamiento de humanos
en situaciones donde se cree que la capacidad inmunológica
es un factor importante, por ejemplo, enfermedades de autoin-
10 munidad, (v.g., lupus eritematoso, colitis ulcerativa, ane-
mia hemolítica autoinmune, tirotoxicosis, artritis reumatoi-
de, cirrosis hepática) aplasia y displasia tímicas, aumento
de inmunidad en padecimientos infecciosos, (v.g., bacteria-
les, virales y de hongos), enfermedad de Hodgkin, síndrome
15 hipogamaglobulinémico, proliferación de células aberrantes,
decrecimiento de la capacidad inmunológica debido a una dis-
minución temporal en la producción de hormona tímica en es-
tados de inmuno-supresión inducidos química o radiológica-
mente, etc.

20 Se ha encontrado que, la prealbúmina humana
cuando está esencialmente libre de impurezas, preparada co-
mo se describe después, exhibe actividad en el ensayo de ro-
seta in vitro a niveles inferiores de un nanogramo.

25 Aún cuando es deseable para muchos propósitos
utilizar prealbúmina humana esencialmente pura en una compo-
sición adecuada para administración terapéutica, la purifi-
cación y preparación tediosas del material puro en grandes
cantidades, requieren considerable pérdida del material y
el costo y esfuerzo concurrentes, lo cual hace aconsejable
30 utilizar para muchos fines terapéuticos, fracciones menos
puras conteniendo prealbúmina humana, siempre que dichas



04 JUN 1

1 fracciones estén libres de impurezas citotóxicas. Así, se
ha encontrado que fracciones parcialmente purificadas que
exhiben actividad en la prueba de roseta in vitro a aproxi-
madamente 0,01 a 0,20 microgramos, son altamente útiles pa-
5 ra fines terapéuticos.

La prealbúmina humana, en forma esencialmente
pura o como un componente de una fracción libre de impure-
zas citotóxicas, parcialmente purificada, puede obtenerse
en forma de preparaciones farmacéuticas o medicinales con-
vencionales, mezclándola con excipientes no tóxicos, farma-
céuticamente aceptables. Por ejemplo, el material se puede
mezclar con vehículos farmacéuticos inertes orgánicos o
10 inorgánicos adecuados para administración por vía parente-
ral, por ejemplo, intramuscular, subcutánea o intravenosa-
mente en forma de, por ejemplo, soluciones líquidas, suspen-
siones y similares, en dosis unitarias o divididas.

Las composiciones farmacéuticas que contienen
el material presente pueden someterse a operaciones farma-
céuticas convencionales tales como esterilización (v.g.,
20 por filtración de miliporo) y pueden contener excipientes
farmacéuticos convencionales tales como preservativos, agen-
tes de estabilización, agentes emulsificantes, agentes de
abultamiento-ligamiento, sales para el ajuste de la presión
osmótica, o reguladores. Las composiciones pueden contener
25 también otros materiales terapéuticamente útiles o materia-
les que prolonguen la duración de acción del compuesto pre-
sente. Los métodos actuales para preparar tales formas de
dosis son conocidos o serán evidentes para aquellos peri-
tos en la materia. Una compilación extensiva de tales técni-
cas de formulación puede encontrarse, por ejemplo, en "Re
30



1 mington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Un mé
todo preferido para preparar formulaciones que contienen el
presente material es por reconstrucción de la prealbúmina
humana liofilizada. Así, la prealbúmina humana preparada co
5 mo se describió anteriormente puede esterilizarse y liofili
zarse ya sea sola o con otros excipientes sólidos y guardar
se en un medio estéril hasta que se necesite. Inmediatamen
te antes de la administración se agrega la cantidad desea
da de solvente, v.g., agua, agua conteniendo preservativos
10 o una solución de varios excipientes en agua, para disolver
la prealbúmina humana.

En cualquier caso, la composición farmacéuti
ca que va a administrarse contendrá una cantidad de prealbú
mina humana en una cantidad terapéuticamente efectiva para
15 el tratamiento del padecimiento particular.

El régimen de dosis puede consistir de dosis
unitarias o divididas, pero en cualquier caso necesariamen
te dependerá de las necesidades del sujeto que está siendo
tratado y del juicio del médico que lo atiende. Sin embar
20 go, como una guía extensa para la mayoría de los propósitos,
el material presente esencialmente puro se administrará en
el régimen de aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ a aproximadamen
te 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$, con preferencia aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$
a aproximadamente 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$. Expresado en términos al
25 ternativos para un adulto medio (70 Kg.), éste podría ser
de aproximadamente 0,7 $\text{ng}/\text{día}$ a aproximadamente 1,4 $\text{mg}/\text{día}$,
preferiblemente de aproximadamente 7 $\text{ng}/\text{día}$ a aproximadamen
te 0,2 $\text{mg}/\text{día}$ o en una escala determinada por el resultado
del tratamiento diario inicial a la dosis anterior. Necesari
30 amente una fracción menos pura se administrará en dosis



1 correspondientemente mayores.

5 La prealbúmina humana puede aislarse como un componente de una fracción parcialmente purificada, libre de impurezas citotóxicas, o en forma esencialmente pura, partiendo de sangre humana o una fracción de sangre humana fácilmente disponible por medio de un procedimiento de purificación de múltiples pasos.

10 Una fuente de prealbúmina humana particularmente valiosa es la fracción de sangre humana conocida como la fracción Cohn IV-1, que se obtiene y descarta generalmente como una fracción de deshecho durante el fraccionamiento de la sangre humana. Esta fracción es por lo tanto, disponible en grandes cantidades de fuentes sanguíneas y es relativamente barata. En promedio, la fracción Cohn
15 IV-1 exhibe actividad en el ensayo de roseta in vitro a aproximadamente 24 microgramos. En términos de actividad en el ensayo de roseta, la fracción de Cohn IV-1 representa aproximadamente una purificación de 10 veces del suero humano crudo. Así, la prealbúmina humana pura exhibe actividad
20 en el ensayo de roseta inferior a un nanogramo, típicamente de 0,2 a 1,0 nanogramos representa un mejoramiento de actividad de 24000 a 120000 veces comparado con la fracción Cohn IV-1 y un mejoramiento de actividad de 240000 a
25 1.200.000 veces comparada con la actividad del suero crudo humano. Se cree que este mejoramiento en actividad es debido en parte, a la remoción de una fracción inhibitoria normalmente presente en el suero. El procedimiento complejo de purificación necesario para lograr tal grado notable de mejoramiento de actividad y para producir el material esencialmente puro, se describe después.
30



1 El procedimiento para la purificación de pre
albúmina humana partiendo de la fracción Cohn IV-1 involu-
cra los pasos siguientes:

- 5 1.a. Filtración molecular para excluir material de
alto peso molecular y material de bajo peso mo-
lecular, o
b. separación fraccionada con sulfato de amonio,
2. Cromatografía en gel
3. Repetición del paso 2, o electroforesis de
10 flujo libre
4. Electroforesis preparativa en gel, y
5. cromatografía en gel.

15 Durante cada etapa del procedimiento de puri-
ficación las diversas fracciones que se generan se ensayan
rutinariamente, con preferencia usando el ensayo de roseta
in vitro para determinar la actividad semejante a la de la
hormona del timo. La fracción o fracciones que contienen la
mayor parte de dicha actividad se procesan además en las
20 etapas finales concentrando así las fracciones activas en
volúmenes cada vez más pequeños, separando a la vez el com-
ponente activo de impurezas inactivas hasta que se obtiene
el material deseado en forma esencialmente pura. Aún cuando
las representaciones preferidas de los pasos de purifica-
ción bosquejados anteriormente se describen en los Ejemplos
25 1 y 9, una breve descripción del procedimiento de purifica-
ción se presenta después:

30 Si se desea, la fracción cruda Cohn IV-1 puede
liofilizarse opcionalmente. Esto se hace convenientemente
suspendiendo la fracción Cohn IV-1 cruda en agua destilada
o deionizada, agitando para romper las burbujas y removien-



1 do después el disolvente y otros volátiles bajo presión re-
ducida.

5 El material liofilizado tiene mayor estabili-
dad y puede almacenarse en el frío durante períodos exten-
sos. Antes de la purificación, la fracción Cohn IV-1 cruda
o liofilizada se prepara como una solución acuosa y con pre-
ferencia se centrifuga para eliminar el sedimento.

10 Para la filtración molecular se usa como disol-
vente agua destilada o deionizada, ajustando preferiblemen-
te el pH aproximadamente a 7 y para la separación fracciona-
da con sulfato de amonio, se utiliza un regulador acuoso.

15 En una representación del presente proceso la
fracción Cohn IV-1 (cruda o preferiblemente liofilizada) di-
suelta en agua destilada o deionizada se somete a dos fil-
traciones moleculares para eliminar los componentes que tie-
nen pesos moleculares sustancialmente superiores e inferior-
es a los del componente deseado. Una técnica de filtración
molecular adecuada involucra, inicialmente, el paso de la
solución mencionada anteriormente a través de un fracciona-
20 dor de fibra hueco con un filtro de membrana adecuada para
eliminar los componentes de alto peso molecular (mayores
que aproximadamente 60-70 mil daltones, dependiendo de la
presión de filtración). Fraccionadores de fibra huecos ade-
cuados son (dependiendo del volumen del sustrato), los fra-
25 ccionadores Amicon DC-2 y DC-30. Cuando se usa el fraccio-
nador DC-2 una membrana para filtro adecuada es el Amicon
HIDX-50. Con el fraccionador DC-30 un filtro adecuado es el
Amicon HIOX-50.

30 El filtrado de la filtración molecular ante-
rior se somete a otra filtración molecular para eliminar



1 materiales de bajo peso molecular. Así, el paso a través de
un fraccionador de fibra hueco, similar, ajustado con una
membrana para retener el material de peso molecular de apro-
ximadamente 10.000 daltones o mayor produce el material dese-
5 seado que tiene un peso molecular de aproximadamente 56.700
daltones, que se aísla de la retención. Un filtro adecuado
para este fin con el aparato DC-2 es el Amicon HIDP-10, y
con el aparato DC-30, el Amicon HIOSM.

10 Alternativamente, el procedimiento de filtra-
ción puede invertirse, de modo que se remuevan primero las
impurezas de bajo peso molecular y después las impurezas de
alto peso molecular. El primer procedimiento es el preferi-
do.

15 En una segunda y preferida representación, la
fracción Cohn IV-1 cruda o con preferencia liofilizada se
somete a separación fraccionada con sulfato de amonio. Por
este procedimiento se obtiene un rendimiento mucho más al-
to (aproximadamente de ocho veces) del material deseado com-
parado con las técnicas de separación fraccionada molecular
20 descritas anteriormente.

25 La fracción Cohn IV-1 se disuelve primero en
un regulador adecuado que tenga un pH entre aproximadamente
7,8 y 8,2 tal como la Tris, conocida comúnmente como tris-
(hidroximetil)aminometano -azida sódica y con preferencia
se centrifuga para eliminar sedimento. La solución se trata
entonces secuencialmente con porciones de sulfato de amonio
a una temperatura entre aproximadamente 0 y 5°C, para sali-
ficar varias fracciones. Después de cada adición de sulfato
de amonio, el precipitado formado se separa de la capa so-
30 brenadante, que se trata además con sulfato de amonio.



1 La fracción que contiene el material deseado
se "salifica" o precipita, cuando se agrega el sulfato de
amonio para llevar el contenido de sulfato de amonio de la
solución a una saturación de aproximadamente 40 a 60%. La
5 cantidad de sulfato de amonio necesaria para alcanzar el
grado de saturación apropiado puede determinarse fácilmente
a partir de tablas de solubilidad.

10 El precipitado que contiene el material deseado se desalifica preferiblemente por técnicas bien conocidas en la materia, por ejemplo, por diafiltración o preferiblemente por diálisis de una solución del precipitado en agua destilada. El material desalificado se concentra entonces en preparación para el siguiente paso, por ejemplo, por liofilización partiendo del estado congelado.

15 En el siguiente paso, el material deseado de la filtración molecular previa o separación fraccionada con sulfato de amonio se somete a cromatografía en una columna de gel de polisacáridos la cual fracciona por peso molecular los componentes aplicados en la misma. Las columnas
20 adecuadas son aquellas preparadas a partir de dextranos de enlaces cruzados tal como Sephadex G-75, G-100, G-150 ó G-200 (Pharmacia Fine Chemicals). Un material preferido es Sephadex G-150, que produce una separación óptima de componentes como se determina por examen de la K_{av} en contraste
25 con la curva del logaritmo del peso molecular (Ver Andrews, Biochem. J., Vol. 91, p. 222, 1964). Dicha cromatografía en gel se lleva a cabo en forma adecuada pasando a través de la columna cargada una elución reguladora acuosa que tiene un pH de aproximadamente 7,8 a 8,2, preferiblemente a alrededor de pH 8,0. Un regulador adecuado es el Tris-NaCl-Na₂CO₃.

30



1 La temperatura debe ser entre aproximadamente 0 y 10°C, pre-
feriblemente a alrededor de 5°C. Las fracciones eluidas se
colectan de la cromatografía en gel y la, o las fracciones,
que contienen el componente deseado pueden determinarse por
5 absorción ultravioleta, proteína total eluida o bioensayo.
La columna se puede calibrar para que la fracción eluida
que contiene el promedio del peso molecular deseado pueda
determinarse fácilmente (ver Andrews, citado anteriormen-
te).

10 La fracción o fracciones deseadas se desalifi-
can preferiblemente por diálisis o con preferencia por dia-
filtración y concentran en la preparación para el siguiente
paso, por ejemplo, por liofilización. La diafiltración se
lleva a cabo bajo presión (v.g., 70-80 psi/nitrógeno) a tra-
15 vés de una membrana con la medida de poros apropiada, para
que el material deseado se retenga. Membranas adecuadas que
pueden mencionarse son Amicon UM-05 y UM-10, que tienen un
peso molecular que varía de 500 a 10.000, respectivamente.
Otras membranas que pueden usarse son Amicon UM-2, PM-10 ó
20 UM-20E.

En el siguiente paso, el material anterior de
la cromatografía en gel se recicla a través de la misma co-
luna de gel u otra similar, o alternativamente, se somete
a electroforesis de flujo libre. La electroforesis de flujo
25 libre se lleva a cabo de acuerdo con los procedimientos de
por sí conocidos en la materia. El pH debe ser entre aproxi-
madamente 5,0 y 5,5, preferiblemente de alrededor de 5,25.
Un regulador preferido para establecer dicho pH es el ace-
tato de sodio-ácido acético. La localización del componente
30 deseado puede nuevamente establecerse mediante el uso de ab



1 sorción ultravioleta, proteína total y/o métodos de bioensa-
yos y/o mediante el uso de una columna calibrada.

5 El material desecado obtenido en el paso ante-
rior se somete entonces a electroforesis preparativa en dis-
co de gel de poliacrilamida, en la forma usual para dicho
procedimiento. Es preferible que tal electroforesis se lle-
ve a cabo en tal forma que el separador de gel y elución re-
10 guladora tengan un pH entre aproximadamente 8,5 y 9,5, con
preferencia a alrededor de 8,9. Un regulador preferido para
establecer dicho pH es el Tris-HCl. Normalmente, después
de este procedimiento, se obtiene la prealbúmina humana
electroforéticamente homogénea. La homogeneidad del compo-
15 nente obtenido puede determinarse por técnicas analíticas
standard tales como el uso de electroforesis analítica de
gel de disco o enfoque isoeléctrico, y la actividad hormo-
nal puede determinarse por bioensayo. Como paso final, el
material se libera del ácido poliacrílico y las sales resi-
20 duales por cromatografía como se describió anteriormente,
en una microcolumna de polisacáridos preferiblemente de Sep-
hadex G-75. El primer pico que se eluye de la columna con-
tiene el material activo, lo que se juzga por el criterio
mencionado anteriormente, y el producto en sí mismo puede
obtenerse por liofilización.

25 En los ejemplos específicos siguientes se des-
criben las preparaciones de la prealbúmina humana esencial-
mente pura, y de la parcialmente purificada, así como los
bioensayos utilizados y los resultados obtenidos de los mis-
mos. Debe reconocerse por aquellos peritos en la materia
30 que las descripciones aquí contenidas son solamente ilustra-
tivas de la invención y no deben considerarse en ninguna



1 forma como limitantes del campo o esencia de la invención.

La literatura citada anteriormente y en los ejemplos se incorpora aquí como referencia y forma parte de la misma.

5 EJEMPLO 1

Purificación de prealbúmina humana a partir de la fracción Cohn IV-1.

10 Cuatro kilos de la fracción de sangre humana Cohn IV-1 (Cutter Laboratories) se agitaron en 20 litros de agua destilada dos veces, a 5°C por 4 horas, y se liofilizaron para dar 1105 g. de material seco que se suspendió en 10 volúmenes de agua deionizada. El pH se ajustó a 7,0 con hidróxido de amonio y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El sedimento se eliminó y la capa sobrenadante se pasó a través de un cartucho de HIOX-50 en un aparato Amicon DC-30. La fracción de peso molecular inferior obtenida en este paso se pasó a través de un cartucho HIOSM en el mismo aparato. Después de la liofilización del producto retenido se obtuvieron 50 g. del material que se 15 cromatografió en porciones de un gramo (después de la disolución en el regulador mencionado posteriormente) en una columna de Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals) de 5 x 90 cm equilibrada con regulador 50 mM Tris-100 mM NaCl-0,02% azida sódica de pH 8,0 a 5°C. La cromatografía se controló 20 por las medidas de la densidad óptica a 280 nm, los contenidos de cada tubo se liofilizaron y diafiltraron para determinar la proteína total y después se sometieron a un ensayo de roseta in vitro. Se recuperó más del 90% de eluato activo en una fracción ligeramente retardada en esta columna, 25 con un valor de K_{av} de 0,955 correspondiente a una propor-

30



1 ción de peso molecular aproximadamente de 50.000 a 70.000
daltones. Este material (total de todas las corridas de un
gramo = 20 gramos) se sometió entonces a electroforesis de
5 flujo libre a pH 5,25 en un sistema regulador de acetato
(25 mM NaOAc-7 mM HOAc). Como anteriormente, el progreso se
controló por la densidad óptica, proteína total y bioensa-
yo. El material resultante de la combinación de las fraccio-
nes activas se purificó además por electroforesis prepara-
tiva de gel de poliacrilamida usando un 10% de gel de enla-
10 ce cruzado. El espaciador y las muestras de gel de 0,060 M
en Tris, se ajustaron a pH 6,6-6,8 con HCl. El separador
de gel de 0,375 M en Tris, se ajustó a pH 8,9 con HCl. El
regulador del recipiente del electrodo fue 0,024 M en Tris
y 0,192 M en glicina, pH 8,2-8,4. La elución reguladora de
15 0,375 M en Tris, se ajustó a pH de 8,8-9,0 con HCl. La acti-
vidad se eluyó en una fracción migratoria entre el vestigio
de color (azul de bromofenol) y la fracción de albúmina. Es-
te material (aproximadamente 100 mg. en total) se homogenei-
zó electroforéticamente cuando se corrió en un sistema ana-
20 lítico a pH 8,9.

La repetición de la cromatografía de Sephadex
como se describió anteriormente, en una microcolumna (0,8
por 76 cm) dió prealbúmina esencialmente pura como un sólido
25 blanco.

Se encontró que el valor de S_{20w} determinado
por velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga Spinco
modelo E fue de 4,07 y el peso molecular de la molécula de-
terminada por equilibrio de sedimentación fue de 56.700 dal-
tones. Después de tratamiento con clorhidrato de guanidinio
30 5M - ditiotreitol al 0,8%-fosfato 0,01 M (regulador) de pH



1

5,2 seguido de urea 5 M-dodecilsulfato sódico al 0,1% -di
tiotreititol al 1%- buffer de fosfato 0,01 M de pH 7,4 segui
do de electroforesis a pH 7,0 en gel de acrilamida conte
niendo dodecilsulfato sódico, se encontró que el peso mole
cular del material no disociado fue de 52.000 daltones y
5 hubo disociación parcial en cuatro subunidades con un peso
molecular de aproximadamente 13500 daltones cada una.

10

La proteína fue homogénea por enfoque isoe-
léctrico en gel de poliacrilamida conteniendo anfolinas con
un régimen de pH de 3-10, y tuvo un punto isoeléctrico apro
ximado a 4,5. El análisis de N-terminal obtenido por dansi-
lación indicó la presencia de derivados correspondientes a
la dansilglicina y α -dansilhistidina. La composición de ami
noácidos se determinó por hidrólisis de la proteína y cro
matografía en un analizador de aminoácidos Durrm, bajo con
15 diciones standard y produjo la composición siguiente:

15

<u>Aminoácido</u>	<u>% Molecular</u>
Acido aspártico	6,6
Treonina	9,5
20 Serina	9,3
Acido glutámico	10,3
Prolina	6,6
Glicina	8,3
Alanina	9,7
25 Cistina 1/2	0,9
Valina	9,5
Metionina	0,7
Isoleucina	4,0
Leucina	5,9
30 Tirosina	2,3

30



	<u>Aminoácido</u>	<u>% Molecular</u>
1	Fenilalanina	3,9
	Triptófano	1,0
	Lisina	6,3
5	Histidina	3,1
	Arginina	3,2

La identificación se estableció además por comparación con muestras auténticas de prealbúmina humana.

EJEMPLO 2

10 Ensayo de roseta in vitro durante la purificación de prealbúmina humana

El ensayo de roseta in vitro, se llevó a cabo esencialmente como se describe por Bach, J.F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 68, p. 2734 (1974). El protocolo exacto fue como sigue:

15

A. preparación de una solución tipo de la sal sódica de azatioprina.

20

Se disolvieron 277 mg. del ácido de azatioprina libre, (Imuran, Burroughs Wellcome) en 25 ml. de agua en un matraz volumétrico. Se agregó aproximadamente 1 ml. de NaOH 1N, gota a gota, con agitación, para disolver todo el polvo. La solución final se diluyó 1:100 en una solución de sal de Hank balanceada, pH 7,2, preparada a partir de un medio en polvo (Difco Labs., Detroit, Mich) para dar una solución conteniendo 0,106 mg/ml. de la sal sódica de azatioprina, pH 8,2. Esta solución se filtró a través de un filtro de miliporo para efectuar la esterilización. La solución final se almacenó fuera de la luz en un refrigerador. La estabilidad se chequeó midiendo la densidad óptica a 280 y 30 330 nm.



1 B. Para el ensayo en sí mismo se usaron células
del bazo de un ratón macho adulto C57Bl/6 Simonsen de 6 a 8
semanas, timentomizado 7 a 30 días antes de sacrificarlo.,
5 Los bazos individuales se homogeneizaron y lavaron en solu-
ción de sal de Hank balanceada y enfriada. Las células se
aglutinaron a 200 x g. durante 10 minutos en una centrifuga
refrigerada. Se preparó una suspensión final de $40-60 \times 10^6$
de células nucleadas por mililitro.

10 Series de control: Para determinar la sensibi-
lidad de las células de bazo timentomizado a la sal sódica
de azatioprina, la sal sódica de azatioprina se tituló, com-
prendiendo de 25µg/tubo a 1,56 µg/tubo, usando diluciones
seriadas dos veces de 0,25 ml. de la solución tipo (parte A)
en solución de Hank. La suspensión de células del bazo pre-
15 parada anteriormente (0,1 ml.) se agregó a cada dilución
($4,6 \times 10^6$ células/tubo).

20 Series de prueba: Las fracciones de prueba de
prealbúmina humana (alícuotas de 0,125 ml.) se diluyeron se-
riadamente dos veces en solución de Hank. A cada dilución
de la fracción de prueba se le agregaron 2,5 microgramos de
la sal sódica de azatioprina en 0,125 ml. de solución de
Hank (ver antes) y 0,1 ml. de la suspensión de células del
bazo.

25 Ambas series, de control y de prueba, se incu-
baron a 37°C en un baño de agua durante 60 minutos. 0,2 ml.
de eritrocitos de borrego al 50% (SRBC) en solución de Al-
sever (Grand Island Biological Co., "Gibco", Grand Island,
N.Y.), preparada 2 días previamente, se diluyó en 15 ml. de
solución de Hank. Se agregaron a cada tubo en ambas series
30 0,125 ml. de esta suspensión SRBC y las células se agluti-



1 naron en una centrifuga con refrigeración a 200 x g. duran
te 5 minutos. Las células aglutinadas se refrigeraron a
4°C por 90 minutos, se suspendieron cuidadosamente en un ro
5 citómetro de Malessez.

La actividad específica se determinó por la
cantidad mínima de proteína en las fracciones de prueba que
inhibieron la formación de roseta en un 50% o más en presen
10 cia de 2,5 µg/tubo de la sal sódica de azatioprina. La ac
tividad específica de las fracciones obtenidas durante la
purificación (Ejemplo 1) se muestra en el cuadro siguiente,
que es un factor de purificación relativo, usando la frac
ción Cohn IV-1 como una referencia.

15	Paso	Fracción	Actividad en Ensayo de ro seta (µg de proteína)	Factor de puri fica ción.
	1	Fracción Cohn IV-1.	24	1
	2	Cartucho de retención DC-30 HIOSM.	3	8
20	3	Cromatografía en Sephadex G-75, pH 8, fracción 2.	0,1	240
	4	Electroforesis de flujo li bre, pH 5,25, fracción 2.	0,01	2.400
	5	Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, pH 8,9, fracción 1.	0,002	12.000
25	6	Cromatografía en micro- Sephadex G-75, fracción 1.	0,0004	60.000

El cuadro anterior demuestra el uso del ensa
30 yo de roseta in vitro para controlar la purificación de la
prealbúmina humana, y demuestra que se ha logrado una puri-



1 ficación de 60,000 veces, basada en la actividad de la frac-
ción Cohn IV-1.

EJEMPLO 3

Estimulación de síntesis de anticuerpos

5 Cuando los animales normales o animales que
están abatidos experimentalmente en su respuesta inmunoló-
gica, se inyectan con un antígeno extraño, v.g., una proteí-
na obtenida de otra especie, la estimulación ocurre de un
mecanismo de defensa inmunológico, v.g., síntesis de anti-
10 cuerpos que tienen la capacidad para "neutralizar" el mate-
rial extraño.

15 Protocolo: se trataron ratones normales (de
la clase C57BL/6) con una sola inyección intravenosa, de
eritrocitos de borrego (SRBC) como un estimulante antigéni-
co. Al mismo tiempo los ratones de prueba se inyectaron in-
travenosamente con una cantidad de prealbúmina humana (una
fracción apropiada como se ilustra en el cuadro en el Ejem-
plo 2). Los ratones control recibieron el antígeno y albúmi-
na de suero de bovino (BSA). Siete días después los anima-
20 les se sacrificaron, se diseccionaron los bazo y cada uno
se utilizó para el ensayo de anticuerpos in vitro, de acuer-
do con el método de Jerne, H. K., et al, Science, Vol. 140,
p. 405 (1963). La respuesta de anticuerpos se expresa como
el número de células que forman placas (PFC) por 10^6 de cé-
25 lulas del bazo.

30 A. El siguiente cuadro ilustra la formación de
anticuerpos utilizando una fracción de prealbúmina humana
("hormona") correspondiente al paso 2 del cuadro en el
Ejemplo 2. Se ensayaron anticuerpos 19S (IgM) y 7S(IgG).



	Material inyectado	$\frac{PFC/10^6}{19S(IgM)}$ células del bazo	$\frac{7S(IgG)}$
1	Solución salina	33	2
	SRBC	105	114
5	SRBC + 10 μ g. hormona	193	112
	SRBC + 100 μ g. hormona	249	173
	SRBC + 400 μ g. hormona	276	310
	Solución salina + 400 μ g. hormona	1	1
10	Solución salina + 400 μ g. BSA	3	1
	SRBC + 10 μ g. BSA	120	119
	SRBC + 100 μ g. BSA	154	76
	SRBC + 400 μ g. BSA	156	152

15 Los datos muestran que la administración de prealbúmina humana incrementa significativamente la capacidad de las células del bazo para sintetizar anticuerpos 7S y 19S.

20 B. El efecto de la prealbúmina humana ("hormona") en la síntesis de anticuerpos se puede demostrar también en un ensayo in vitro. En este caso las células del bazo, de ratones C-57Bl/6J, se cultivaron y se trataron después con eritrocitos de borrego, eritrocitos de borrego más hormona, u hormona sola. La hormona utilizada en este experimento fue del paso 3 del cuadro en el Ejemplo 2. La respuesta de anticuerpos se midió después de 5 días de cultivo. Solamente se midieron los anticuerpos 19S. Los resultados se expresan en el cuadro siguiente:



1	Material agregado al cultivo de células del bazo	Respuesta de Anticuerpo 19S (PFC/10 ⁶ células del bazo)
	-----	46
	SRBC	1332
5	SRBC + hormona (10 µg.)	2097
	SRBC + hormona (50 µg.)	1964
	Hormona (50 µg.)	58

10 Los resultados anteriores demuestran que la preparación de prealbúmina humana fue activa al estimular la síntesis de anticuerpos IgM(19S) cuando se agregó in vitro.

EJEMPLO 4

15 Efecto de la prealbúmina humana en ratones timectomizados neonatalmente

20 Está bien establecido que la timectomía neonatal produce una invalidez inmunológica. Los animales operados dejan de crecer normalmente, muestran agotamiento y tienen poca resistencia a las infecciones, no pueden sintetizar anticuerpos en respuesta a la provocación por antígenos específicos y no tienen inmunidad mediante células, es decir, no pueden rechazar un injerto de piel a partir de una clase alogénica de la misma especie. Generalmente tales animales operados mueren dentro de cinco a diez semanas post operatorias de infecciones generalizadas, dependiendo del grado de agentes infecciosos del medio ambiente en el que se alojan. Este síndrome de timectomía neonatal se ha demostrado en una variedad de especies y también se ha visto en niños que nacen sin timo o con aplasia y displasia tímicas

25
30 Miller, J.F.A.P., et al, Physiol. Revs., Vol. 47, p. 137



1 (1967) y Trainin, N., Physiol. Revs., Vol. 54, p. 272
(1974).

5 Protocolo: Se timectomizaron ratones C-57Bl/
Ka dentro de las 24 horas del nacimiento utilizando técnicas
quirúrgicas estériles y alojamiento bajo condiciones
libres de patógenos infecciosos específicos. Grupos de 10
cada uno de estos ratones timectomizados neonatalmente fue
ron tratados como se indica después. Se usó albúmina de
suero de bovino (BSA) como una proteína de control.

10 A. Síntesis de anticuerpos

 Al principiar las nueve semanas de la post-
mectomía, cada ratón se inyectó intraperitonealmente en
días alternados (ocho inyecciones en total) con 1 mg. por
inyección por ratón, de preparación de prealbúmina humana
15 ("hormona") o BSA. La hormona utilizada para este experi-
mento fue aquélla del paso 2 del cuadro en el Ejemplo 2.
Los animales se sacrificaron una semana después de la últi-
ma inyección de hormona y 5 días después de una sola inyec-
ción intraperitoneal del antígeno, eritrocitos de borrego.
20 Las concentraciones de anticuerpos (19S) se determinaron
de acuerdo con el método de Mishell, R. I., J. Exp. Med.,
Vol. 126, p. 423 (1967). Los resultados se expresan en la
tabla inferior.

25 Respuesta de anticuerpos 19S(PFC/10⁶ células del bazo)

<u>Ratones tratados con hormona</u>	<u>Ratones tratados con BSA</u>
58.650	9.500

30 El cuadro anterior demuestra que la adminis-
tración de la preparación de prealbúmina humana restaura a



1 los ratones timectomizados neonatalmente la habilidad para sintetizar anticuerpos 19S en una respuesta a una provocación de eritrocitos de borrego, un antígeno dependiente tímico.

5 B. La interacción de linfocitos mezclados.

10 Cuando las células linfoides de ratones de una clase específica se mezclan in vitro con células linfoides de ratones de una clase no relacionada, la naturaleza "extraña", desde un punto de vista inmunológico, de las células a otro diferente da por resultado una respuesta proliferativa de cada célula. Como se indica después, en una de las dos agrupaciones celulares se puede impedir la proliferación, o sufrimiento de blastogénesis por adición a una agrupación celular, antes de mezclar, un agente que inhiba la división celular. La habilidad de las células para reconocer o admitir células extrañas es un reflejo de una respuesta inmunológica mediante células. Esto es lo que se llama reacción de "una forma" de linfocitos mezclados.

20 Las células linfoides de ratones timectomizados neonatalmente o de ratones (carentes) sin timo genéticamente son incapaces de este tipo de reconocimiento, es decir, no responden a la reacción de linfocitos mezclados cuando se incuban con células linfoides de ratones adultos de otra clase.

25 El protocolo usado fue aquel descrito por Goldstein, A. L., et al., J. Immunol., Vol. 106, p. 773 (1971).

30 Los datos mostrados abajo se obtuvieron con células linfonodulares de ratones C57Bl/Ka timectomizados neonatalmente tratados a las cuatro semanas de edad con in



1 yecciones subcutáneas, únicas, en un período de dos se-
 5 nas, de un miligramo cada una de "hormona" correspondiente
 al paso 2 del cuadro en el Ejemplo 2. Un grupo control de
 ratones C57Bl6/Ka timectomizados neonatalmente recibieron
 10 dosis similares de un miligramo de albúmina de suero de bo-
 vino. Los animales se sacrificaron entonces y se disecciona-
 ron los nódulos linfáticos (mesentéricos, axilares e ingui-
 nales) y bazos. Suspensiones celulares de los nódulos de
 linfa de cada ratón se trataron en la reacción linfocítica
 15 mezclada, usando iguales números de células (A) linfonodu-
 lares C57Bl6/Ka y células (B) alogénicas (BLA). La incorpo-
 ración "fundamental" para cada tipo de célula se obtuvo se-
 paradamente y dedujo del valor de la reacción de células
 20 mezcladas para dar la diferencia en cuentas por minuto
 (Δ CPM), resultante de la interacción de los dos tipos de
 células.

Los datos obtenidos fueron como sigue:

Tratamiento	<u>³H-Incorporación de Timidina</u>	
	Δ CPM ¹	Indice de estimulación ²
Albúmina de suero de bovino	11.596	28,4
Hormona	18.358	48,8

25 ¹ Δ CPM = AXB - (A + B)

²Indice de estimulación = $\frac{AXB}{A + B}$

30 Es evidente que las células linfonodulares de los animales tratados con la preparación de prealbúmina humana muestran un incremento aproximadamente de dos veces en



JUN 15 1957

1 el índice de estimulación. Estos datos indican que las cé-
lulas de los ratones timectomizados neonatalmente tratados
con esta preparación fueron significativamente mejorados
en su capacidad inmunológica como se refleja en su capaci-
5 dad para "reconocer" las células linfonodulares de una cla-
se histoincompatible de ratones.

EJEMPLO 5

Proliferación del tejido linfoide

10 Los ratones que son privados de su glándula
timo dentro de 24-48 horas de su nacimiento (timectomía ne-
natal) o ratones (carentes) atímicos genéticamente dejan de
desarrollar tejido linfoide normal. Esto es, sus nódulos
linfáticos y bazo (los órganos linfoides) son pequeños y
muestran una insuficiencia de linfocitos. Esto es un refle-
15 jo del hecho que tempranamente en la vida, el timo produce
gran número de células linfoides que se exportan hacia, y
siembran, los órganos linfoides periféricos cuando estas
células proliferan. Esto da por resultado normalmente cre-
cimiento y maduración de las estructuras linfoides norma-
20 les.

25 Protocolo: a ratones (carentes) atímicos ge-
néticamente de 4 semanas de edad se les dió ocho inyeccio-
nes subcutáneas, diariamente, de 1 mg. de la preparación de
prealbúmina humana ("hormona") correspondiente al paso 2
del cuadro del Ejemplo 2 en un período de 2 semanas antes
de sacrificarlos. Ratones control, recibieron inyecciones
de 1 mg. de albúmina de suero de bovino. Los nódulos linfá-
ticos (mesentéricos, inguinales y axilares) se disecciona-
ron, secaron y colectaron y se contó el número total de cé-
30 lulas linfoides. Los datos son como sigue:



1

Albúmina de suero de bovino

Hormona

Tejido	Nº de células	Nº de células
Bazo	$1,02 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
Nódulos linfoides	$21,3 \times 10^6$	$41,5 \times 10^8$

5

Puede notarse que la proliferación de células linfoides en ratones normales debe ser bajo regulación tímica. Los ratones (carentes) sin timo genéticamente tienen tejido linfoide pequeño, no desarrollado. Los datos anteriores indican un incremento, en los ratones tratados con prealbúmina humana, en el número de células linfonodulares por un factor de $\sim 2 \times 10^2$, i.e., un incremento de 200 veces.

10

EJEMPLO 6

15

Estimulación por mitógenos: Blastogénesis en exposición a la Concanavalina A.

20

Las células linfoides de ratones carentes, debido a que son irrespondientes inmunológicamente, no reaccionan a la Concanavalina A, un mitógeno conocido por actuar sobre las células T capaces inmunológicamente, acelerando su maduración y diferenciación.

25

Protocolo: El tratamiento de ratones carentes fue como se describió para la proliferación del tejido linfoide (Ejemplo 5) usando la misma preparación y cantidad de prealbúmina humana. El ensayo usado se describe por Claman, H. N., J. Immunol., Vol. 112, p. 960 (1974) basado en la incorporación de ^3H -timidina en las células linfoides incubadas in vitro con y sin adición de Concanavalina A (miles-Yeda, Kankakee, Ill.)

30



1	Datos obtenidos:	CPM ³
	Células de ratones tratados con BSA + fosfato-solución isotónica reguladora + Concanavalina A	110
5	Células de ratones tratados con hormo- na + fosfato-solución isotónica regula- dora + Concanavalina A	419

³H-timidina incorporada por tubo de incubación.

10

La inyección de la preparación de prealbúmina humana incrementó en aproximadamente 4 veces la respuesta mitogénica de las células a la Concanavalina A. Por lo tanto, la administración de este material a ratones carentes, incrementó el número de células de paciente que exhiben propiedades de células T en su respuesta al mitógeno.

15

EJEMPLO 7

Maduración *in vitro* de linfocitos humanos a las células T capaces inmunológicamente

20

El número de células que forman rosetas E es espontáneas de eritrocitos en linfocitos de la sangre periférica es un índice de la capacidad inmunológica del paciente, puesto que este índice refleja el número de células T capaces inmunológicamente circulantes.

25

En individuos normales, el número de células de roseta E en la sangre periférica representa generalmente el 65-80% de la población linfocítica total. Se observan frecuentemente valores inferiores a este rango en estados deficientes inmunológicamente, incluyendo enfermedades malignas, aplasia o displasia tímicas, artritis reumatoide, etc.

30

Protocolo: los linfocitos se separaron de la



1

sangre periférica humana en un gradiente de Ficoll-Hypaque, Boyun, A., Scan. J. Clin. Lab. Invest., Vol. 21: Supl. 97, (1968). Los linfocitos T se identificaron por la formación espontánea de rosetas con eritrocitos de borrego, Bentwich, Z., et al., Clin. Immunol. Immunopath., Vol. 1, p. 511 (1973).

5

Se considera significativo un cambio de $\pm 10\%$ (en una escala de 100%). Los datos obtenidos son como sigue:

10

INFLUENCIA DE PREALBUMINA HUMANA (HORMONA CORRESPONDIENTE AL PASO 3, CUADRO, EJEMPLO 2) IN VITRO EN TANTO PORCIENTO DE CELULAS QUE FORMAN ROSETAS E ESPONTANEAS DE ERITROCITOS, EN LINFOCITOS DE LA SANGRE PERIFERICA DE INDIVIDUOS NORMALES Y PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HODGKIN.

Linfocitos de siete individuos normales	% inicial de rosetas E	+50 μ g. de Hormona	+Estracto in hibitorio de bazo (RIS) (1)	+RIS (1) +50 μ g. de Hormona
---	------------------------	-------------------------	--	----------------------------------

15

1	70	70	N.D. ^{xx}	N.D. ^{xx}
2	65	65	N.D.	N.D.
3	61	68	N.D.	N.D.
4	66	55	N.D.	N.D.
5	66	60	47	68
6	68	69	48	64
7	72	69	50	71

20

Linfocitos de seis pacientes con enfermedad de Hodgkin.

1	67	66	N.D.	N.D.
2	62	72	N.D.	N.D.
3	48	70	N.D.	N.D.
4	55	70	N.D.	N.D.
5	62	78	43	66
6	43	70	50	54

25

^{xx}N.D. = No hecho

(1) 10 μ g. proteina/tubo de prueba

30



1

Los resultados anteriores sugieren que incubación in vitro con la preparación de prealbúmina humana de linfocitos de la sangre periférica de individuos que tienen porcentajes más bajos que los normales de células que forman rosetas E espontáneas dan por resultado un incremento en el porcentaje de estas células. Tales datos han sido interpretados para indicar que la concentración de hormona ~~tímica~~ inadecuada es la base para los números inferiores de células que forman rosetas E en estas condiciones clínicas. En contraste, las células precursoras están aparentemente presentes en estos individuos puesto que la incubación de estas células con adición de la preparación de prealbúmina humana incrementa el número de células que forman rosetas E espontáneas.

5

10

15

Pacientes con enfermedad de Hodgkin frecuentemente muestran números más bajos que los normales de células que forman rosetas E espontáneas. Los datos anteriores revelan que los linfocitos periféricos en 5 de 6 estudios de pacientes de Hodgkin mostraron, en incubación con la preparación de prealbúmina humana, un incremento significativo en el porcentaje de células que forman rosetas E espontáneas.

20

25

En adición, la preparación de prealbúmina humana contrarresta el efecto inhibitorio de un extracto de bazo de pacientes con enfermedad de Hodgkin en el número de células que forman rosetas E espontáneas en los linfocitos de sangre periférica de individuos normales y en un paciente con la enfermedad de Hodgkin.

30



EJEMPLO 8

Actividad en la preparación de prealbúmina humana in vivo.

El ensayo anterior de células que forman rosetas de borrego referido en el Ejemplo 2, se aplicó también en ensayos en los que se administró in vivo una preparación de prealbúmina humana altamente purificada (correspondiente al paso 6 del cuadro en el Ejemplo 2). El protocolo fue como sigue:

La preparación para ensayarse se administró a ratones C57Bl/6 adultos normales (de 6-8 semanas de edad) que habían sido timectomizados dos semanas antes de usarlos. Se les dieron intraperitonealmente en dosis de 2-4 µg por ratón, inyecciones diarias en cada uno de los tres días sucesivos.

A las 24 horas siguientes a la última inyección, los animales se sacrificaron, los bazo se extrajeron rápidamente, las suspensiones celulares se prepararon y se usaron en el ensayo de roseta. Los datos se representan abajo:

Punto final

Ratón normal, no timectomizado	0,78 µg. de azatioprina
Ratón timectomizado, inyectado con solución salina	25 µg. de azatioprina
Ratón timectomizado, inyectado con 2 µg. de preparación	0,195 µg de azatioprina
Ratón timectomizado inyectado con 4 µg de preparación	0,098 µg de azatioprina

Los datos anteriores muestran que la capaci-



1 dad inmunológica fue restaurada para las células del bazo
de ratones timectomizados por la administración de la prepa-
ración. Debe hacerse notar que la inyección de la prepara-
ción de prealbúmina humana purificada restauró a las célu-
5 las del bazo de los ratones timectomizados una sensibilidad
a los efectos inhibitorios de azatioprina, basada en el nú-
mero de células que forman rosetas del bazo, igual a aquel
de las células del bazo de ratón normal. La actividad abso-
luta de la preparación usada en este ensayo es de 0,4 ng.
10 en el ensayo in vitro.

EJEMPLO 9

Purificación alternativa de prealbúmina humana de la frac-
ción Cohn IV-1

15 Se agitan 100 g. de la fracción Cohn IV-1 (pe-
so húmedo) con 500 ml de agua destilada durante cuatro ho-
ras a 2-5°C. La suspensión se liofiliza entonces, dando
aproximadamente 40 g. de un polvo seco. Este material se
disuelve entonces en 1000 ml. de Tris 50 mM -cloruro de so-
dio 100 mM-regulador de azida sódica al 0,02%, pH 8,0, y
20 se agita por tres horas a temperatura ambiente. La solu-
ción se centrifuga entonces a 13.000 x g. durante 30 minu-
tos a 2-5°C. La capa sobrenadante de color verdoso claro
en un recipiente adecuado rodeado de hielo se satura enton-
ces al 40% con sulfato de amonio por la adición de 243 g.
25 de sulfato de amonio a 1000 ml. de la capa sobrenadante.
La suspensión se deja sedimentar a 5°C durante la noche y
el precipitado se remueve por centrifugación. La capa so-
brenadante se satura entonces al 60% con sulfato de amonio
por la adición de 132 g. de sulfato de amonio a 1000 ml. de
30 la capa sobrenadante y el precipitado se colecta como an-



1 tes. El precipitado se disuelve entonces en el volumen mínimo de agua destilada y dializa exhaustivamente contra agua destilada en frío y liofiliza para dar 17 g. del material.

5 El material anterior, en alícuotas de 1 g., se aplica a una columna de 5 x 90 cm. de Sephadex G-150 (volumen total de 1.760 centímetros cúbicos) equilibrada con Tris 50 mM-cloruro de sodio 100 mM-azida sódica al 0,02%, pH 8,0 y la columna se eluye con el mismo regulador. El material eluyente en el régimen de peso molecular de 40.000-10 70.000 daltones se colecta, desalifica por diafiltración a través de una membrana de Amicon UM-10 a 70-80 psi de presión de nitrógeno y liofiliza. El material total obtenido después de todas las graduaciones de 1 g. en la columna de Sephadex es de 4 g.

15 Después de la cromatografía de este material, en alícuotas de 1 g. como se describe anteriormente, usando la misma columna de Sephadex, seguido de diafiltración y liofilización como antes, se obtienen 2 g. del material.

20 El cuadro inferior ilustra el peso del material y la actividad en el ensayo de roseta in vitro, como se describió en el Ejemplo 2.

Material	peso en seco (gramos)	actividad - ensayo de roseta (µgs.)
Cohn IV-1	40	12
25 Precipitado de sulfato de amonio al 40-60%	17	1,6
G-150, Fracción 3	4	0,20
G-150, Fracción 3, repetición	2	0,02

30



1

El material del procedimiento anterior puede someterse a electroforesis preparativa de gel de poliacrilamida y cromatografía en una microcolumna como se describió en el Ejemplo 1 para producir el material objeto, esencialmente libre de impurezas, exhibiendo actividad en el ensayo de roseta in vitro comparable a la que se describió en el Ejemplo 2, es decir, de aproximadamente 0,2 a 1,0 ng.

5

EJEMPLO 10

Efecto de prealbúmina humana in vitro en la promoción de maduración de células capaces inmunológicamente.

10

Los timocitos inmaduros de ratones normales no son normalmente células T con actividad citotóxica significativa. La aceleración de la maduración de estos timocitos a linfocitos que exhiben actividad citotóxica es una indicación del mejoramiento de la capacidad inmunológica.

15

Protocolo: se cultivaron timocitos 1×10^7 de ratones C-57Bl/6 con células del bazo de ratón Balb/c irradiadas 5×10^6 , con y sin 5 μ g. del material correspondiente al último paso en el cuadro del Ejemplo 9, ó 5 μ g. de BSA, por 5 días. La citotoxicidad se mide en células P815 Y(H-2^d) marcadas con ⁵¹Cr.

20

% de Liberación de ⁵¹Cr

Timocitos + Balb/c + 5 μ g. de BSA	15
Timocitos + Balb/c + 5 μ g. de preparación de prealbúmina humana	45

25

Los datos anteriores demuestran que células linfoides que normalmente no exhiben actividad citotóxica, incrementan significativamente la citotoxicidad como un re-

30



1 sultado de su exposición in vitro a la preparación de preal-
búmina.

EJEMPLO 11

5 Como se indicó anteriormente en el Ejemplo 5,
las células linfoides del ratón carente son generalmente
irrespondientes inmunológicamente. Se condujo un estudio
del efecto de una preparación de prealbúmina humana para
elucidar una respuesta inmunológica de las células del ba-
zo de ratón carente incubadas in vitro. La reacción de lin-
focitos mezclados (ver Ejemplo 4 anterior) fue el sistema
10 de ensayo.

Protocolo: se cultivaron células del bazo
5 x 10⁵ de ratones nu/nu (fundamentalmente Balb/c) con cé-
lulas del bazo de ratón F₁ (Balb x C57/K6), irradiadas 5 x
15 10⁵, por tres días, con trimidina tritiada durante las últi-
mas cuatro horas. Se utilizó una concentración de 2 µg./tu-
bo de preparación de prealbúmina humana (hormona) corres-
pondiente al último paso en el Cuadro del Ejemplo 9. Los
valores son promedios ± S.E. para los tres experimentos.

Fuente celular	Singeneica		Alogeneica	
	Hormona	BSA	Hormona	BSA
bazo nu/nu	1241 ± 74	1027±95	6725±75	1567±67

25 Los datos muestran que, aún cuando las célu-
las del bazo de ratón carente incubadas con albúmina de
suero de bovino no responden en la reacción de linfocitos
mezclados, células similares incubadas con 2 µg. de la pre-
paración de hormona por células del bazo 5 x 10⁵ no dotan
efectivamente estas células con la capacidad para funcio-
30 nar en la reacción de linfocitos mezclados. Por lo tanto,



1 la hormona convirtió las células que no responden inmunológicamente a células con actividad inmunológica.

EJEMPLO 12

Autosensibilización de linfocitos *in vitro*.

5 Cuando las células linfoides de un animal se dejan incubar ya sea in vitro o en una cámara incluida, con células no linfoides del mismo animal, ocurre un fenómeno que se denomina autosensibilización. Esto es, las células linfoides inmunológicamente activas son capaces de
10 reconocer que otro tipo de células no es idéntico sino, en este sentido, es extraño. El hecho de que esto ocurre puede determinarse por la evaluación del grado de citotoxicidad de estos linfocitos sensibilizados. Esto se hace midiendo la extensión de lisis o destrucción de células (células objetivo) a las cuales los linfocitos se han sensibilizado por mezcla de las células sensibilizadas con las células objetivo marcadas con un isótopo, generalmente una sal de cromo marcada radioactivamente. Después de la incubación y como un resultado de la lisis de las células objetivo, se libera la radioactividad de las células marcadas en el medio donde puede medirse la cantidad liberada. El porcentaje de la radioactividad total liberada se toma como una medida del grado de citotoxicidad de las células linfoides sensibilizadas (Takagusi, M. and Klein, E. Transplantation, 9:219, 1970).

15
20
25
30
Protocolo: preparación de linfocitos de sangre periférica: los linfocitos se separaron de la sangre total por el método del gradiente de Ficoll-Isopaque. Boyum, A., Scand. J. Clin. Lab. Inv., Vol. 21 (supp.97), p.77 (1968).



1

Medio de cultivo: se cultivaron estratos de fibroblastos y células objetivo en un medio de Earle más suero fetal de becerro al 10% (Gibco). La sensibilización de linfocitos y el ensayo de citotoxicidad se llevaron a

5

cabo en medio de RPMI 1640 (Gibco) complementado con suero positivo AB humano al 10%, glutamina 2 mM y regulador de Hepes 4 mM (Gibco).

10

Sensibilización in vitro de linfocitos: Se usaron fibroblastos de piel normal, entre su tercero y décimo pasaje in vitro, fueron sembrados en matraces de cultivo de tejido plásticos (25 cm², Falcon, Oxnard, USA). Un poco antes de que alcanzaran su confluencia, los estratos se irradiaron (4.000 R) con una máquina de rayos X (Siemens, stabilipan 15 mA, 22 KV, Filter Al 1. mm., proporción de dosis 362 R/min, distancia: 40 cm). Se vertieron aliquotas de las células linfoides (de 10⁷ a 1,5 x 10⁷) en los matraces con y también sin los estratos. El medio de cultivo se reemplazó en el día 3. En el día 6 los linfocitos se recuperaron pipeteando y lavando con medio fresco. Solamente un pequeño porcentaje de las células linfoides quedaron unidas firmemente al estrato de sensibilización. Los linfocitos colectados se lavaron dos veces y contaron en presencia de azul de tripano para estimar la viabilidad.

15

20

25

Ensayo de citotoxicidad mediante células:

Los linfocitos se probaron por el método de Takagusi M. and Klein. E., Transplantation, Vol. 9, p. 219 (1970). Se sembraron 400 células objetivo (fibroblastos de piel) en un volumen de 20 µl por recipiente. Después de incubar durante la noche, el 50% de las células se fijaron. Los linfocitos se agregaron en un volumen de 20 µl y la reacción se

30



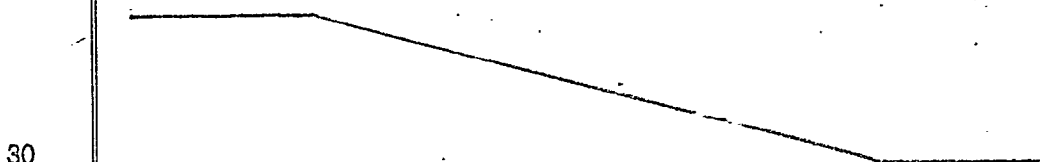
1 suspendió después de 48 horas. El número de células objeti
vo restantes se registraron después de lavar con solución
salina de fosfato regulador, pH 7,4, fijando con metanol y
5 tiñendo las placas con Giemsa (Gibco). El número de células
en los recipientes expuestos a los linfocitos cultivados
previamente sin los estratos sensibilizantes, se tomaron
como la línea base para la evaluación de la citotoxicidad.
El número de células en los recipientes sembrados con lin-
focitos sensibilizados y en recipientes de medio de control
10 se comparó por consiguiente con este valor.

El efecto de la "hormona" (correspondiente a
la preparación en el paso 4 en el cuadro del Ejemplo 2) en
la autosensibilización descrita anteriormente se probó co-
mo sigue:

15 Se agregaron 10 µg de hormona en 0,1 ml. del
medio RPMI 1640 a matraces de sensibilización conteniendo
4 ml. del medio de cultivo.

20 En los primeros dos estudios (materia C.C.)
la hormona estuvo presente durante los seis días de sensi-
bilización. En el experimento restante (materia G.K.) la
hormona estuvo presente solamente durante los primeros
tres días, en dicho tiempo el medio fue reemplazado. Los
linfocitos se removieron y probaron para su actividad cito
tóxica como se describió anteriormente.

25 Los resultados se muestran en la tabla si-
guiente:





Origen de linfocitos	Fibroblastos sensibilizantes	Adición de hormona ^M	L/T [§] : 200/1		Número de células/recipiente		Promedio ± S.E. % reduc.	Promedio ± S.E. % reduc.	L/T : 50/1		
			±	S.E.	±	S.E.					
G.C. ^{MM}	G.C.	-	587	± 17	23 ^{xxx}	427	± 27	21 ^{xx}	505	± 21	7
G.C.	G.C.	+	730	± 41	4	544	± 25	0	531	± 21	2
G.C.	-	-	760	± 13	3	542	± 17	0	544	± 18	-2
G.C.	G.C.	-	736	± 33	32 ^{xxx}	543	± 44	0	554	± 8	19 ^{xxx}
G.C.	G.C.	+	360	± 31	5	333	± 29	32 ^{xxx}	446	± 24	0
G.C.	-	-	504	± 39	36	503	± 36	-2	544	± 11	0
G.K.	G.K.	-	529	± 36	18	491	± 18	17 ^x	552	± 23	3
G.K.	G.K.	+	330	± 18	10	228	± 16	10	393	± 14	3
G.K.	-	-	432	± 17	30	249	± 13	10	459	± 17	3
G.K.	-	-	482	± 30		276	± 13		474	± 23	

Significación estadística: xxx P < 0,001

xxx P < 0,01

x P < 0,05

P < 0,05

^M 10 µg de hormona a matraces de sensibilización. Presente en todos los 6 días de sensibilización en los experimentos 1 y 2; presente solamente durante los primeros 3 días en el experimento 3.

^{MM} Iniciales de células donantes de materia.

[§] L/T Linfocitos - relación de células objetivo.

1

5

10

15

20

25

30

1

5

10

15

20

25

30

Origen de linfocitos	Fibroblastos sensibilizantes	Adición de hormona ^{II}	L/T ⁹ : 200/1 Promedio \pm S.E. \bar{x}	
C.C. ^{III}	C.C.	-	537	\pm 17
C.C.	C.C.	+	730	\pm 41
C.C.	-		760	\pm 13
-	-		736	\pm 33
C.C.	C.C.	-	360	\pm 31
C.C.	C.C.	+	504	\pm 39
C.C.	-		529	\pm 36
G.K.	G.K.	-	330	\pm 18
G.K.	G.K.	+	432	\pm 17
G.K.	-		482	\pm 30

Significación estadística: xxx P < 0,001

xx P < 0,01

x P < 0,05

P \leq 0,05



Identificación	L/T [§] : 200/1			Número de células/recipiente L/T : 100/1			L/T : 50/1		
	Promedio	± S.E.	% reduc.	Promedio	± S.E.	% reduc.	Promedio	± S.E.	% reducción
587	± 17	23 ^{xxx}		427	± 27	21 ^{xx}	505	± 21	7
730	± 41	4		544	± 25	0	531	± 21	2
760	± 13			542	± 17		544	± 18	
736	± 33	3		543	± 44	0	554	± 8	-2
360	± 31	32 ^{xxx}		333	± 29	32 ^{xxx}	446	± 24	19 ^{xx}
504	± 39	5		503	± 36	-2	544	± 11	0
529	± 36			491	± 18		552	± 23	
330	± 18	32 ^{xxx}		228	± 16	17 ^x	393	± 14	17 ^{xx}
432	± 17	10		249	± 13	10	459	± 17	3
482	± 30			276	± 13		474	± 23	

: xxx P <0,001

xx P <0,01

x P <0,05

P <0,05

^{xx} 10 µg de hormona a matraces de sensibilización. Presente en todos los 6 días de sensibilización en los experimentos 1 y 2; presente solamente durante los primeros 3 días en el experimento 3.

^{xxx} Iniciales de células donantes de materia.

[§] L/T Linfocitos - relación de células objetivo.



1 Es evidente partiendo de los datos que las
adiciones a los matraces de sensibilización de 10 µg de la
preparación de hormona, ya sea para los seis días completos
de sensibilización o solamente durante los primeros tres
5 días del período de sensibilización de seis días previenen
en ambos casos la aparición de células citotóxicas. Esto es,
la preparación de hormona bloqueó el fenómeno de autosensi-
bilización. Los datos indican la utilidad potencial de la
preparación para evitar o mejorar un avance en el proceso
10 de autosensibilización que puede ser un factor etiológico
en las enfermedades autoinmunes.

EJEMPLO 13

Autosensibilización de linfocitos *in vivo*.

15 Protocolo: se usó la técnica utilizada en el
Ejemplo 12 para examinar el efecto de la preparación de hor-
mona en la autosensibilización in vivo. Además, se examinó
el papel principal de la glándula timo y sus hormonas, que
influyen en esta autosensibilización. El procedimiento di-
fiere de la autosensibilización anterior in vitro en que la
20 autosensibilización se logró colocando las células objetivo
(células de tumor fibrosarcoma MC57M de ratones de la misma
clase) mezcladas con células del bazo del paciente, en una
cámara de miliporo de celda impermeable e insertando des-
pués la cámara en la cavidad peritoneal de ratones normales
25 C57Bl/6 o ratones de esta clase que han sido timectomizados
al mes de edad. La preparación de hormona se administró in
vivo; se inyectaron 20 µg. 1 hora antes y 6 horas después
de la implantación de la cámara y luego cada día hasta el
30 día 4 de sensibilización. Los animales se sacrificaron en



1 el 50 día; las células, en su mayor parte linfocitos, se re-
cuperaron de cada cámara y ensayaron para la citotoxicidad,
usando fibroblastos marcados ⁵¹Cr (de ratones de la misma
clase) como células objetivo.

5 Los datos obtenidos son los siguientes:

Cámara paciente	Número de células/recipiente Promedio ± S.E.	% de re- ducción ^a
Tx + hormona ^{ix}	429 ± 13	-2 [†]
Tx	294 ± 7	30 ^{†††}
10 Intacto (compañeros de cría)	393 ± 9	6 [†]
b	420 ± 20	

a ^{†††}, P. < 0,001; ^{††}, P. < 0,01; [†], P. ≥ 0,5

15 b células del bazo preparadas recientemente usadas como
controles.

^{ix} correspondiente al paso 4 del cuadro, Ejemplo 2.

20 Los datos anteriores indican que la inyección
de la preparación de hormona in vivo en ratones timectomiza-
dos bloquearon efectivamente el desarrollo de la autosensi-
bilización de los linfocitos que contiene la cámara por las
células del fibrosarcoma del ratón. Estos datos junto con
el ejemplo anterior de bloqueo por la hormona de autosensi-
bilización in vitro, indican además la utilidad potencial
25 de la preparación de hormona en enfermedades humanas en las
que un componente etiológico es la autoinmunización, es de-
cir la inhabilidad para reconocer "por sí mismo".

EJEMPLO 14

30 Lo siguiente ejemplifica composiciones (por
dosis) farmacéuticas representativas de la presente inven-



1970

1

ción, ilustradas para una preparación correspondiente al último paso en el cuadro del Ejemplo 9.

5

- A. Preparación de prealbúmina humana 1,0 mg.
- Cloruro de sodio 9,0 mg.
- Agua para la inyección q.s. 1,0 ml.

10

- B. Preparación de prealbúmina humana 1,0 mg.
- Fosfato sódico monobásico monohidratado. 5,4 mg.
- Fosfato sódico dibásico 8,66 mg.
- Cloruro de sodio 2,52 mg.
- Agua para la inyección q.s. 1,0 ml.

15

- C. Preparación de prealbúmina humana 1,0 mg.
- Manitol 100 mg.
- Agua para la inyección q.s. 1,0 ml.

20

- D. Preparación de prealbúmina humana 1,0 mg.
- Fosfato sódico monobásico monohidratado 5,4 mg.
- Fosfato sódico dibásico 8,66 mg.
- Manitol 25 mg.
- Agua para la inyección q.s. 1,0 ml.

25

Todos los ingredientes sólidos se disuelven en agua y liofilizan en una ampolleta estéril. Antes de la administración, se agrega agua para disolver los sólidos. Para las ampolletas que van a usarse en dosis múltiples es preferible que el agua contenga un preservativo, v.g., se usan 1,2 mg. de metilparaben por mililitro y 0,12 mg. de propilparaben por mililitro. Las composiciones reconstituidas pueden almacenarse a 4°C hasta dos semanas.

30

En resumen, la Patente de Invención que se solicita, deberá recaer sobre las siguientes

1

REIVINDICACIONES

5

1. Un método para la preparación de prealbúmina de suero humano, esencialmente libre de impurezas, que consiste en someter la fracción de sangre humana conocida como la fracción Cohn IV-1 a:

10

a. separación fraccionada con sulfato de amonio,

b. cromatografía en una columna de gel de polisacárido que fracciona los componentes aplicados en la misma por peso molecular,

c. repetición del paso (b) o electroforesis de flujo libre,

d. electroforesis preparativa en disco de gel de poliacrilamida, y

15

e. cromatografía en una microcolumna de gel de polisacárido que fracciona los componentes aplicados a la misma por peso molecular.

2. Un método de la reivindicación 1, donde la fracción Cohn IV-1 se liofiliza antes del paso (a).

20

3. Un método de la reivindicación 1, donde en el paso (a), la separación fraccionada con sulfato de amonio consiste en adicionar secuencialmente sulfato de amonio a una solución de la fracción Cohn IV-1 cruda o liofilizada en buffer acuoso de un pH entre aproximadamente 7,8 y 8,2 y a una temperatura entre aproximadamente 0 y 5°C, dando por resultado cada adición la formación de un precipitado y una porción sobrenadante y separando dicho precipitado de la porción sobrenadante en cada adición.

25

4. Un método de la reivindicación 3, donde el precipitado resultante de una adición de sulfato de amonio, la cual incrementa el contenido de sulfato de amonio de la

30

1 solución acuosa de aproximadamente 40 a aproximadamente -
60% de saturación, se utiliza en el siguiente paso.

5 5. Un método de la reivindicación 1, donde en -
los pasos (b) y (e), el gel de polisacárido empleado es un
dextrano de enlace cruzado.

6. Un método de la reivindicación 1, donde en -
los pasos (b) y (e), se emplea un buffer de elución que tie
ne un pH entre aproximadamente 7,8 y 8,2 y la temperatura -
es entre aproximadamente 0 y 10°C.

10 7. Un método de la reivindicación 1, donde el pa
so (c) es una repetición del paso (b).

15 8. Un método de la reivindicación 1, donde en el
paso (d), la electroforesis preparativa en disco de gel de
poliacrilamida emplea un gel separador y un buffer de elu-
ción que tiene un pH entre aproximadamente 8,5 y 9,5.

20 9. Un método de la reivindicación 1, donde el ma
terial obtenido después del paso (a) y el material obtenido
después del paso (b) se desalifica y liofiliza antes de -
usarse en el siguiente paso.

10. Un método de la reivindicación 9, donde el ma
terial obtenido después del paso (a) se desalifica por diá-
lisis y el material obtenido después del paso (b) se desali-
fica por diafiltración.

25 11. Un método de la reivindicación 1, donde la -
fracción o fracciones deseadas de cada paso se determinan -
con respecto al rango del peso molecular de sus componentes
y/o ensayando los mismos para la actividad semejante a la -
hormona del timo.

30

1

12. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN METODO PARA LA PREPARACION DE PREALBUMINA DE SUERO HUMANO.

5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de cuarenta y nueve páginas mecanografiadas.

Madrid, 24 Marzo 1.976
BERNARDO UNGRIA
P.P.



10

15

20

25

30