



- 6 NOV. 1977 (10) ES

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

(11) NUMERO	(10) A1
(21) 461.060	
(22) FECHA DE PRESENTACION	
27-Julio-1.977	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO 20984/77	28-2-77	Japón

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C 07 G	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(54) TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN PREPARADO DE LISOZIMA HUMANA"

(71) SOLICITANTE (S)

THE GREEN CROSS CORPORATION (A2363-04 Green)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1-47, Chuo-1-chome, Joto-ku, Osaka, Japón

(72) INVENTOR (ES)

Kazuo TAKECHI, Tsuyoshi TAKAHASHI, Toyoaki INABA y Eiichi HASEGAWA

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ (P.- 66.530)

IAR.

**POOR
QUALITY**

1 Este invento se refiere a un procedimiento para producir lisozima humana. Más particularmente, se refiere a un procedimiento para producir lisozima a partir de la fracción de albúmina de la sangre humana.

5 "Lisozima" es un término general para las enzimas que catalizan la hidrólisis de los mucopolisacáridos presentes en la pared celular de los microorganismos y en las que se disuelven. En la clara de albumen de los huevos de ave el contenido de lisozima es tan alto como 3% basado en la proteína total, de modo que las preparaciones de lisozima se han producido predominantemente a partir de la clara de los huevos de gallina. Por otro lado, la lisozima se encuentra también en los fluidos de los seres humanos tal como lágrimas, moquillo, sangre y orina, aunque el contenido es bastante bajo excepto en las lágrimas. Un contenido mayor de lisozima se encuentra en los fluidos corporales de los pacientes leucémicos. En 1967, Osserman aisló por primera vez la lisozima humana en una forma cristalina a partir de la orina de los pacientes de leucemia monocítica por medio de adsorción en bentonita (Osserman: Science, 155, 1536-1537 (1967)).

15
20
25
30
Puesto que la lisozima aislada de la clara de huevo es una proteína heterogénea en un cuerpo humano, se restringe en dosis y vía de administración cuando ha de darse a seres humanos como medicina. Además, su actividad enzimática se dice que es $1/2$ a $1/3$ tan baja como la de la lisozima humana. Sin embargo, la cantidad de lisozima contenida en los fluidos corporales disponibles o en los tejidos de los seres humanos normales es bastante pequeña. Por ejemplo, el contenido en la sangre humana normal es tan

1 - bajo como 2-10 ppm. Actualmente su separación eficaz y re-
cuperación a partir de la sangre humana normal no se prac-
tica comercialmente. Por todo esto, es natural que ni --
las lágrimas ni el moquillo, ni la orina de los pacientes
5 leucémicos, puedan utilizarse como fuente de lisozima co-
mercialmente.

El objeto de este invento es proporcionar un pro-
cedimiento eficaz para separar lisozima de la sangre huma-
na y purificarla.

10 Los autores del presente invento llevaron a cabo
un estudio amplio con el fin de realizar el objeto antes
mencionado. Como resultado, descubrieron un hecho inespera-
do, que la lisozima era capaz de concentrarse en la frac-
ción de albúmina de la sangre. Los inventores también des-
15 cubrieron que la lisozima podía aislarse de la fracción de
albúmina por un procedimiento sencillo.

Por lo tanto, de acuerdo con este invento se pro-
porciona un procedimiento para producir lisozima humana
que comprende fraccionar los componentes de la sangre hu-
20 mana por diferencia de solubilidad para recoger la fracción
de albúmina, poner en contacto la fracción de albúmina con
un intercambiador catiónico débilmente ácido para dejar
que el intercambiador adsorba la lisozima presente en las
fracciones de albúmina, desorber la lisozima adsorbida y
25 recuperar la lisozima desorbida.

La sangre humana empleada en el procedimiento de
este invento es preferiblemente una sangre humana normal
que incluye la sangre presente en el tejido placentario y
la sangre retroplacentaria. Es bien sabido que la fracción
30 de albúmina puede separarse de dicha sangre humana de acue-

1 do con el método de fraccionamiento por la utilización de
la diferencia de solubilidad, basándose principalmente di-
cho método en el fraccionamiento con sulfato de amonio o
el fraccionamiento con alcohol a baja temperatura de Cohn.
5 De acuerdo con el método de fraccionamiento con sulfato de
amonio, la fracción de albúmina de la sangre se recoge en
forma de precipitados que se forman cuando la concentración
de sulfato de amonio está en el intervalo de 45% al 75%
de la saturación. De acuerdo con el método con alcohol a
10 baja temperatura de Cohn, la fracción de albúmina de la
sangre se recoge como fracciones IV-1 y V. Estas fraccio-
nes se purifican y venden como una preparación de albúmi-
na. Un número de técnicas para modificar o mejorar los pro-
cedimientos de fraccionamiento y purificación han sido men-
15 cionados en publicaciones. Dichos documentos son, por ejem-
plo y muy brevemente, (1) a partir del plasma o suero: una
técnica que comprende someter el líquido sobrenadante de
la fracción IV-1 de Cohn de nuevo a fraccionamiento con
una concentración de etanol del 25 al 38% (patente de
20 EE.UU. n.º 2.958.628); una técnica que comprende separar
las sustancias proteínicas impuras tales como lipoproteína
de la fracción IV-1 empleando ácidos orgánicos y acrinol
(patente de EE.UU. n.º 4.017.470); una técnica que compren-
de recuperar la albúmina del precipitado de la fracción
25 IV-4 (patente de EE.UU. n.º 3.850.903); una técnica que
comprende añadir un ácido graso a una solución acuosa que
contiene albúmina, calentar la mezcla resultante y luego
recuperar una albúmina purificada (patente de EE.UU. n.º
2.765.299 y n.º 2.705.230); (2) a partir de placenta: una
30 técnica que comprende tratar un extracto líquido de placen

1 ta sucesivamente con ácido cítrico, fenol y carbonato de
sodio para eliminar las impurezas y luego recuperar la al-
búmina (publicación de patente japonesa nº 7762/1973); una
técnica que comprende fraccionar un extracto líquido de
5 placenta con sulfato de amonio, añadir ácido butírico a
la fracción, calentarla y luego recuperar la albúmina del
líquido sobrenadante (publicación de patente japonesa nº
16041/1968); una técnica que comprende emplear un alcohol
y una sal de ácido graso en lugar del ácido butírico en es-
10 ta última técnica (patente de EE.UU. nº 3.926.939); una
técnica que comprende emplear ácido mandélico o ácido ca-
proico y ácido etilendiamintetraacético en su lugar (paten-
te japonesa Kokai (sometida a inspección pública) nº
88621/1976); una técnica que comprende emplear ácido mandé-
15 lico en su lugar (publicación de patente japonesa nº
40132/1976) y una técnica que comprende emplear ácido ca-
prílico y cloroformo en su lugar (patente británica nº
1.441.752).

Los procedimientos anteriores pueden emplearse
20 todos para obtener la fracción de albúmina empleada en el
presente invento. Entre ellos se prefieren los procedimien-
tos descritos en la patente de EE.UU. nº 4.017.470 y
2.958.628 cuando la materia prima es plasma o suero. Y, en
caso de fuente de placenta, es recomendable un procedimien-
25 to que comprende una etapa de calentar la fracción de albu-
mina a partir de la fuente de placenta en presencia de un
ácido orgánico que tiene de 4 a 8 átomos de carbono para
eliminar las sustancias proteínicas impuras, habiéndose
descrito anteriormente dicho procedimiento.

30 Más particularmente, los procedimientos reivindi-

1 - cados en las patentes de EE.UU. nº 4.017.470 y 2.958.628
son respectivamente como sigue:

5 "Un método para preparar una solución proteíni-
ca de plasma estable al calor que no muestra acción depre-
siva de la presión sanguínea, que comprende añadir agua
destilada a una pasta IV-1, una fracción obtenida del méto
do de fraccionamiento del plasma con etanol frío, de Cohn,
extraer las proteínas solubles en agua en la pasta y sepa-
rar los sólidos contenidos en la mezcla centrifugando para
10 obtener un extracto que contiene proteínas solubles en
agua, tratar con calor el extracto resultante a pH 4,5 a
5,5 a 50° a 65°C con un ácido orgánico que tiene de 4 a 8
átomos de carbono hasta una concentración final del ácido
orgánico de 2 a 6% en p/v, separar como precipitados por
15 filtración o centrifugación las lipoproteínas y glicopro-
teínas contenidas en el extracto, añadir lactato de 2-eto-
xi-6,9-diaminoacridina en una cantidad de 0,2 a 3,0 g por
litro del líquido sobrenadante al sobrenadante resultante,
dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente o inferior
20 y separar las lipoproteínas residuales de precipitación
que dan turbidez al líquido sobrenadante, y luego separar
las sustancias depresoras de la presión sanguínea presen-
tes en el líquido sobrenadante resultante por adsorción
con un adsorbente inorgánico o intercambiador catiónico"
25 y

"En el procedimiento de fraccionamiento de las
proteínas del plasma humano por precipitación fraccionada
con etanol frío, después de la separación de todos los
componentes de coagulación y de toda la gamma-globulina,
30 la etapa de precipitar una mezcla de albúmina, alfa-globu-

1 lina y beta-globulina a una concentración de etanol de 25
al 38%, un pH de 4,3 a 4,7, una temperatura entre -2°C y
el punto de congelación de la solución, una fuerza iónica
menor de 0,12 y una concentración de proteínas mayor de
5 2,2%."

Como ejemplo del procedimiento preferible en el
caso de la fuente de placenta, se menciona la traducción
de la reivindicación de la publicación de patente japonesa
nº 40.132/76 como sigue:

10 "Un procedimiento para recuperar una proteína de
plasma humano estable al calor a partir de placenta humana
o sangre retroplacentaria, caracterizado por emplear como
materia prima placenta humana o sangre retroplacentaria que
ha sido congelada y reservada inmediatamente después de su
15 suministro, separar la gamma-globulina de la solución del
componente de sangre fraccionada de la materia prima para
obtener un líquido sobrenadante, añadir al sobrenadante
ácido mandélico sólido o en solución hasta que la solución
contenga el ácido a una concentración de 2,5-5,0%, mante-
20 ner el pH de la solución de reacción a 4,4-5,5, calentar
la solución a 58-62°C, separar todos los precipitados for-
mados y recuperar la sustancia objeto del líquido sobrena-
dante".

25 En este invento, la fracción de albúmina antes
mencionada o su preparación purificada puede utilizarse
eficazmente. Esto es debido al descubrimiento de los inven-
tores de que a través del fraccionamiento de la sangre por
diferencia de solubilidad la lisozima se comporta justo de
la misma forma que la albúmina y ambos ingredientes se con-
30 centran en fracciones de albúmina. Ningún investigador ha

1 -tenido conocimiento de este comportamiento de la lisozima,
y la lisozima concentrada ha sido considerada como una
simple impureza en la preparación de albúmina.

5 El procedimiento para recuperar lisozima de acuer
do con este invento comprende fraccionar el plasma humano,
suero humano o sangre derivada de la placenta humana tal
como extracto de placenta humana o de la sangre retropla-
centaria humana para aislar las fracciones de albúmina por
10 diferencia de solubilidad, poner en contacto las fraccio-
nes de albúmina aisladas con un intercambiador catiónico
débilmente ácido para adsorber lisozima en el intercambia-
dor, desorber la lisozima adsorbida y recuperar la lisozi-
ma desorbida.

15 Cuando este procedimiento se combina con un pro-
cedimiento para obtener una preparación de albúmina, puede
obtenerse lisozima junto con una albúmina más purificada,
que es uno de los aspectos característicos de este inven-
to. Por consiguiente, el material de partida empleado en
este invento es preferiblemente una solución purificada de
20 fracción de albúmina que no ha sido todavía esterilizada,
filtrada, secada y formada en una preparación. La solución
contiene una albúmina, que tiene una pureza de 50 a 97%
basada en la proteína total.

25 Los intercambiadores catiónicos débilmente áci-
dos preferiblemente utilizables en este invento incluyen
carboximetil-celulosa (CM-celulosa); fosfo-celulosa (p-celu-
losa), carboximetil-Sephadex (CM-Sephadex[®]) que es dextra-
no reticulado con carboximetilo fabricado por Pharmacia
Co., Suecia), y similares. Dicha solución se pone en con-
30 tacto con dicho intercambiador catiónico a un valor de pH

1 de 5-10, preferiblemente 7-9. Los valores de pH de dicha
solución de fracción de albúmina y dicho intercambiador de
cación se ajustan al intervalo antes mencionado, preferi-
blemente por empleo de una solución tampón, tal como solu-
5 ción tampón de fosfato 0,02 M. Pueden estar en contacto
juntos bien mezclándolos simplemente juntos o haciendo pa-
sar dicha solución de fracción de albúmina a través de una
columna rellena con dicho intercambiador de cación. Por es-
te procedimiento, la lisozima de la solución es completa-
10 mente adsorbida en el intercambiador de cación, mientras
que la albúmina permanece en la solución en un estado más
purificado. El intercambiador de cación que ha adsorbido
la lisozima se lava preferiblemente con la misma solución
tampón que antes, después de lo cual la lisozima se eluye
15 del intercambiador de cación de la forma usual con un elu-
yente tal como una solución alcalina (pH 10-12), una solu-
ción muy concentrada de una sal neutra inorgánica (por ejem-
plo, solución aproximadamente al 5-15% de cloruro de sodio)
o una solución acuosa de una sal neutra inorgánica que tie-
20 ne una concentración de aproximadamente 15 a 30% y un va-
lor de pH de 8 a 10.

Aunque no están particularmente limitadas condi-
ciones distintas a las anteriores en los procedimientos de
adsorción y desorción, la temperatura empleada puede ser
25 una temperatura ambiente de 3-20°C, y la cantidad de inter-
cambiador de cación débilmente ácido empleado está usualmen-
te en el intervalo de aproximadamente 30-100 ml por 1 li-
tro de solución de partida que contiene 3-10% (P/V) de al-
búmina.

30 La concentración de lisozima en el eluato se eva-

1 lua midiendo la $DO_{280\text{ nm}}$ con respecto al contenido de pro-
teína y por turbidimetría (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119,
384-386 (1965)) con respecto a la valoración de lisozima.
El eluato se dializa contra agua durante 10-20 horas hasta
5 que han sido casi eliminadas las sales inorgánicas. Subs-
iguientemente, su valor de pH se ajusta a 5,0-6,0 y, si es
necesario, se trata con calor a 60°C durante 10 horas con
el fin de inactivar los virus de hepatitis (la lisozima es
resistente a una temperatura alta en este límite), después
10 de esto se esteriliza y filtra dando una solución de pre-
paración de lisozima inyectable. Finalmente, la solución
puede liofilizarse dando una masa sólida de preparación de
lisozima.

15 La preparación de lisozima así obtenida tiene
una pureza del 60% o más y puede emplearse directamente
como una inyección intra-venosa, intra-arterial o intra-mus-
cular. Naturalmente, también puede administrarse a los se-
res humanos en forma de colirio, aerosol o preparación oral.
Puede administrarse en cualquier momento sin existencia de
20 reacción alérgica en una dosis de 0,1-20 mg por 1 kg de
peso corporal cuando se emplea en forma de inyección - -
y en una dosis de 0,2-10 mg/ml cuando se emplea como una
lágrima artificial o un colirio.

25 También es posible obtener una lisozima cristali-
na por una purificación adicional de la preparación de li-
sozima antes mencionada. Es decir, puede obtenerse una li-
sozima cristalina filtrando con gel la solución de lisozi-
ma con dextrano reticulado (por ejemplo, Sephadex G-50[®]
fabricada por Pharmacia, Co., Suecia) a un valor de pH de
30 5-6 para mejorar la pureza de la lisozima hasta el 90%,

1 dializar la solución purificada contra una solución de clo-
ruro de sodio (pH 4-5) y luego concentrar la solución dia-
lizada. El dibujo que se acompaña, preparado a partir de
una fotografía, ilustra una vista ampliada (en 400 veces)
5 del cristal así obtenido.

La lisozima humana producida de acuerdo con
este invento puede administrarse oralmente a pacientes que
tengan aquellas enfermedades en las que son aplicables las
preparaciones de lisozima usuales derivadas de la clara de
10 huevo. También, la lisozima humana producida de acuerdo
con este invento puede administrarse eficazmente por inyec-
ción, y por tanto el alcance de aplicabilidad de la prepa-
ración puede extenderse. Por ejemplo, la lisozima puede de-
jarse actuar sobre un foco bacteriano de supuración en el
15 cuerpo por inyección directamente en el foco o por vía de
la arteria. También es posible dejar inhalar a un paciente
asmático la preparación de lisozima de este invento a una
concentración elevada con el fin de eliminar el esputo ca-
paz de obstruir el bronquio en el momento del ataque asmá-
20 tico, por lo que el ataque puede aminorarse sin ninguna
reacción alérgica y algunas veces el paciente puede salvar
se de la muerte asmática..

De acuerdo con el procedimiento de este invento,
puede obtenerse con elevada pureza una preparación de liso-
25 zima humana que nunca había sido comercializada hasta aho-
ra, aplicando el procedimiento de fraccionamiento de sangre
que utiliza la diferencia de solubilidad, que forma el pro-
ducto principal en los procedimientos convencionales para
la producción de preparaciones de albúmina humana. Además
30 el procedimiento de este invento tiene el mérito subsidia-
rio, que puede obtenerse la fracción de albúmina en una for-
28068

1 ma más purificada. Por estas razones, el procedimiento de este invento es bastante valioso desde el punto de vista comercial.

5 La anotación "% (P/V)" en esta memoria y en las reivindicaciones muestra la concentración de un soluto en una solución en la proporción del soluto en unidad de peso y la solución en unidad de volumen.

10 Los detalles de este invento se ilustrarán en los Ejemplos siguientes a los que no está limitado el presente invento.

Ejemplo 1

15 Diez litros de una solución de proteína de plasma térmicamente estable (contenido en proteína 600 g; composición química de la proteína: albúmina 95%, α - y β -globulinas 4%, proteínas que se transfieren desde la región γ al cátodo 1%) que han sido obtenidos de la sangre placentaria de acuerdo con el procedimiento mencionado en el Ejemplo de la publicación de patente japonesa nº 40132/1976
20 se reguló a un valor de pH de $7,0 \pm 0,05$ con solución de NaOH 1N. La solución de proteína de plasma térmicamente estable se hizo pasar a través de una columna rellena con 100 g de CM-celulosa (fabricada por Seikagaku Kogyo K.K.) lavada anteriormente por completo y ajustada a un valor de
25 pH de $7,0 \pm 0,05$. La fracción que pasó era una fracción de albúmina, de la que se determinó la $DO_{280 \text{ nm}}$. Tenía casi el mismo contenido de proteína que se encontró antes de pasarla a través de la columna, de modo que más de 99% de la proteína pasó la columna sin adsorción. La fracción que
30 pasó no contenía lisozima en absoluto, lo que indica que

1 la lisozima fue completamente adsorbida por CM-celulosa.
Con el fin de eliminar la albúmina que quedaba en la columna,
ésta se lavó con aproximadamente 1000 ml del tris-(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico 0,02 M (pH 9,0),
5 y luego con aproximadamente 1000 ml de tris-(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico 0,02 M que contenía 0,13 M de NaCl (pH 9,0) sucesivamente. Subsiguientemente, se hizo pasar tris-(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico
10 0,02 M que contenía 15% de NaCl (pH 9,0) a través de la columna para eludir la lisozima adsorbida. La lisozima eluida tenía una pureza de aproximadamente 80%. El eluato se dializó contra agua corriente, se esterilizó, se filtró, se dividió en viales y se liofilizó. La preparación de lisozima enfriada así obtenida tenía una actividad específica
15 de 3,2 mg/mg y un contenido de proteína total de 1,6 mg. El rendimiento total es 208 mg.

Ejemplo 2

Diez litros de una proteína de plasma térmicamente estable (contenido de proteína 500 g; composición química de la proteína: albúmina 87,0%, α -globulina 8,4%, β -globulina 3,6%, otras proteínas que se transfieren desde la región γ al cátodo 1%) obtenidos de la fracción IV-1 sobrenadante de Cohn de plasma humano de acuerdo con el
25 procedimiento mencionado en la patente de EE.UU. nº 2.958.628 se reguló a un valor de pH de $7,0 \pm 0,05$ con una solución de NaOH 1N. Por otro lado, 600 ml de p-celulosa (fabricada por Seikagaku Kogyo K.K.) que había sido lavada previamente con agua completamente y equilibrada a un valor
30 de pH de $7,0 \pm 0,05$ con una solución tampón de fosfato

1 0,02 M se rellenó en una columna, a través de la cual se
hizo pasar la solución de proteína de plasma térmicamente
estable antes mencionada. La albúmina contenida en la so-
lución pasó sin ser adsorbida. A continuación, la columna
5 se lavó con la misma solución tampón que se había empleado
antes para el equilibrio y luego con tris-(hidroximetil)-
aminometano-ácido clorhídrico 0,02 M que contenía 0,13 M
de NaCl sucesivamente para eliminar completamente la albú-
mina de la columna. Subsiguientemente, se hizo pasar tris-
10 -(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico 0,02 M que
contenía 8% de NaCl (pH 8,5) a través de la columna para
eluir la lisozima adsorbida. El eluato se recogió, diali-
zó contra agua corriente, esterilizó, filtró, repartió en
viales y liofilizó. La preparación de lisozima en vial así
15 obtenido tenía una pureza del 60%, una actividad específi-
ca de 2,4 mg/mg y un contenido de proteína total de 2,1 mg.
El rendimiento total es 30 mg.

Ejemplo 3

20 Se recuperó la lisozima de la misma forma que en
el Ejemplo 1 a partir de 10 litros de una proteína de plas-
ma compuesta principalmente de albúmina (composición quími-
ca de la proteína: albúmina 95%, α - y β -globulinas 4%,
otras proteínas que se transfieren desde la región γ al
25 cátodo 1%) que han sido recuperados del precipitado de la
fracción IV-1 de Cohn de acuerdo con el procedimiento men-
cionado en el Ejemplo 1 de la patente de EE.UU. nº 4.017.470.
La preparación de lisozima en vial obtenido tenía una pure-
za del 65%, con una actividad específica de 2,6 mg/mg y
30 un contenido de proteína total de 1,9 mg. El rendimiento

1 total es 28 mg.

EJEMPLO 4

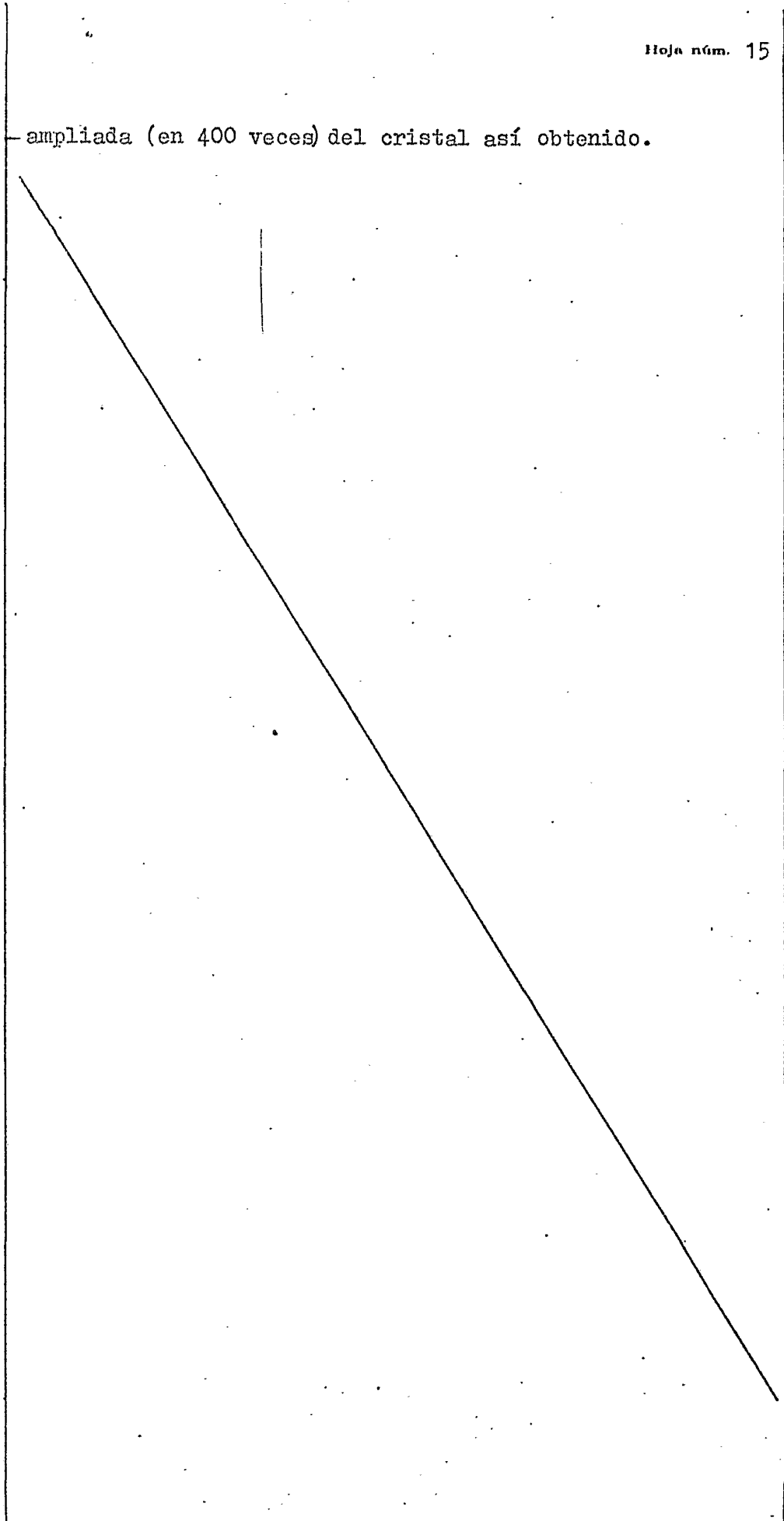
5 Se recuperó lisozima de la misma forma que en el
Ejemplo 1 a partir de 10 litros de una proteína de plasma
térmicamente estable que había sido obtenida calentando
la fracción obtenida a partir de la sangre placentaria a
60°C durante aproximadamente 1 hora a un valor de pH de
10 4,8 en presencia de 4% (P/V) de ácido mandélico y 1 mili-
mol de EDTA de acuerdo con el procedimiento mencionado en
el Ejemplo 1 de la patente japonesa de Kokai (sometida a
inspección pública) nº 88.621/1976 y con lo que se eliminó
un precipitado que contenía hemoglobina y fosfatasa alcali-
15 na. La composición química de la proteína de partida era
como sigue: albúmina 95%, α - y β -globulinas 4%, otras
proteínas que se transfieren desde la región γ al cátodo
1%. La preparación de lisozima en vial obtenida tenía una
pureza de 70% con una actividad específica de 2,8 mg/mg y
20 un contenido de proteína total de 1,8 mg. El rendimiento
total es 150 mg.

EJEMPLO 5

25 Una solución acuosa al 5% de lisozima obtenida
de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 (actividad
específica 3,2 mg/mg; contenido total de proteína 208 mg)
se filtró con gel a un valor de pH de 5,5 con Sephadex
G-50^R. El filtrado se concentró y se dializó contra una
30 solución acuosa al 5% de NaCl que tenía un valor de pH de
4,5. Por tanto, la lisozima se obtuvo en una forma crista-
28068 lina. El dibujo que se acompaña ilustra una vista

1 — ampliada (en 400 veces) del cristal así obtenido.

5
10
15
20
25
30



REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se --
5 presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10 1ª.- Un procedimiento para obtener un preparado de lisozima humana, que comprende fraccionar una sangre humana por diferencia de solubilidad para aislar una fracción de albúmina, poner en contacto dicha fracción de albúmina con un intercambiador de catión débilmente ácido para adsorber la lisozima contenida en dicha fracción de albúmina y desorber la lisozima adsorbida.

15 2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicha fracción de albúmina es plasma humano, suero humano o una sangre placentaria humana.

20 3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicha fracción de albúmina contiene una albúmina que tiene una pureza del 50 al 97% basada en la proteína total.

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicha fracción de albúmina es fracción IV-1 de Cohn.

25 5ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el fraccionamiento se lleva a cabo -- por un método que comprende añadir agua destilada a una -- pasta IV-1, una fracción obtenida del método de fraccionamiento de plasma con etanol frío de Cohn, para extraer las proteínas solubles en agua de la pasta, y separar los sólidos

30

1 dos contenidos en la mezcla por centrifugación para obte--
ner un extracto que contiene proteínas solubles en agua, --
tratar con calor el extracto resultante a pH 4,5 a 5,5 a --
5 50°C a 65°C con un ácido orgánico que tiene 4 a 8 átomos --
de carbono hasta una concentración final de ácido orgánico
de 2 a 6% en peso/volumen, separar como precipitados por --
filtración o centrifugación las lipoproteínas y glicopro--
teínas contenidas en el extracto, añadir lactato de 2-eto--
10 xi-6,9-diaminoacridina en una cantidad de 0,2 a 3,0 g por
litro del líquido sobrenadante al líquido sobrenadante re--
sultante, dejar que la mezcla repose a temperatura ambien--
te o una temperatura inferior y separar por precipitación
las lipoproteínas residuales que dan turbidez al líquido --
sobrenadante, y luego separar las sustancias depresoras de
15 la presión sanguínea presentes en el líquido sobrenadante
resultante por adsorción con un adsorbente inorgánico o un
intercambiador de catión.

6ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi--
cación 1ª, en el que el fraccionamiento se lleva a cabo --
20 por un método que comprende la etapa de separación de to--
dos los componentes de coagulación y toda la gamma-globuli--
na, del plasma, y después, la etapa de precipitar una mez--
cla de albúmina, alfa-globulina y beta-globulina a una con--
centración de etanol de 25 a 38%, un pH de 4,3 a 4,7, una
25 temperatura de entre -2°C y el punto de congelación de la
solución, una fuerza iónica de menos de 0,12 y una concen--
tración de proteínas mayor de 2,2%.

7ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi--
cación 1ª, en el que el fraccionamiento se lleva a cabo --
30 por el procedimiento que comprende calentar la fracción --

1 -de albúmina obtenida a partir de la fuente placentaria en presencia de un ácido orgánico que tiene 4 a 8 átomos de carbono para precipitar y separar las sustancias proteínicas impuras.

5 8ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho intercambiador de catión débilmente ácido es carboximetil-celulosa, fosfo-celulosa o dextrano reticulado con carboximetilo.

10 9ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho contacto se lleva a cabo a un valor de pH de 5 a 10.

10ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho contacto se lleva a cabo a un valor de pH de 7 a 9.

15 11ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicha desorción se lleva a cabo a un valor de pH de aproximadamente 10 a 12.

20 12ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicha desorción se lleva a cabo en una solución acuosa de una sal neutra inorgánica que tiene una concentración de aproximadamente 5 a 15%.

25 13ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicha desorción se lleva a cabo en una solución acuosa de una sal neutra inorgánica que tiene una concentración de aproximadamente 5 a 15% y un valor de pH de 8 a 10.

14ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la solución de material desorbido se calienta a 60°C durante 10 horas.

30 15ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivin-

1 -dicación 1ª, en el que la solución de material desorbido -
se filtra con gel y se concentra para cristalizar la liso-
zima contenida.

5 16ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivin-
dicación 15ª, en el que dicha filtración con gel se practi-
ca por empleo de dextrano reticulado.

17ª.- Un procedimiento para obtener un preparado
de lisozima humana.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede, representado en los dibujos que se acompañan y con -
los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diecinueve hojas escritas
a máquina por una sola cara.

15

Madrid, 08.OCT.1977

P.A.

Oscar de Elizabeth
Por Poder.





Oscar de Elzaburu
For Power.