

361634

PATENTE DE INVENCION

Le A 11 203-Sp.

Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de L-asparaginasa enriquecida cristalizada".



DIRECCION TECNICA	
CLASIFICACION I. I. C.	
CLASE C	12
SUBCLASE D	

Solicitante: FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente en: Leverkusen-Bayerwerk, Alemania.

=====

La L-asparaginasa en forma de un preparado de enzimas más o menos en bruto es conocida. Se ha extraído, según métodos usuales en la química de las enzimas a partir de materiales animales o vegetales y se ha enriquecido. La enzima disocia el enlace ami-

55

**POOR
QUALITY**



5. da en la L-asparagina con lo que se forma ácido L-aspartico y amoniaco. El amoniaco se puede determinar colorimétricamente con el reactivo de Nessler y de ésta manera se dispone de un método de medición para la L-asparaginasa (Cancer Research 26, 2213-17 (1966)).

Como la unidad de L-asparaginasa no ha sido definida aún en forma totalmente concordante se fija aquí como sigue:

10. Una unidad (unidad de 30 minutos) de L-asparaginasa es aquella cantidad que, a 37°C y a un pH de 7,2, en un período de 30 minutos, disocia un μ mol de amoniaco de la L-asparagina. Por lo que se aprecia de la literatura hasta ahora solo se han descrito preparados de L-asparaginasa que contienen como máximo unas 1000 U/mg (Biochemistry 6, 721 (1967)).

15. La preparación se efectuó, entre otros, a partir de células de E. coli de las cuales se liberó la enzima mediante tratamiento con ultrasonido y las soluciones en bruto se saturaron parcialmente con sulfato amónico. La enzima se precipita entonces en forma de sal y se puede seguir enriqueciendo entonces mediante la cromatografía de columna usual en la química de las enzimas. La L-asparaginasa tiene, después de la inyección, un efecto nocivo para aquellos tumores que necesitan para su desarrollo L-asparagina. Se viene, pues, empleando clínicamente cada vez en mayor escala sin que hasta ahora hubiese sido posible disponer de las cantidades necesarias (Proc. N.A.S. 56, 1516-19 (1966)). Ha adquirido una gran importancia en la medicina para combatir el crecimiento maligno.

20.

25.

30.



Se ha descubierto ahora que se puede enriquecer la L-asparaginasa o bien obtener L-asparaginasa cristalizada sí, según la presente invención, preferentemente después de separar los pirógenos, las soluciones acuosas en bruto de L-asparaginasa, en caso dado después de adicionar urea u otras amidas que rompan los puentes de hidrógeno, se mezclan con polialquilenglicol y los precipitados así obtenidos, que contienen L-asparaginasa, se aíslan y en caso dado se siguen purificando.

Siempre que solamente en las soluciones acuosas en bruto de L-asparaginasa se produzcan precipitados con polialquilenglicol y éstos se descompongan según métodos en sí conocidos se procede según el procedimiento de la presente invención mezclando las soluciones de enzima en bruto, que contienen 1 - 30, preferentemente 1 - 10% de L-asparaginasa, con soluciones acuosas de polialquilenglicol, preferentemente de polietilenglicol. Aquí se encuentra la concentración óptima de la solución para el precipitado en un 40 hasta 60% de etilenglicol; sin embargo, también se pueden emplear soluciones de concentración considerablemente inferior. El peso molecular óptimo del polietilenglicol empleado se encuentra entre 1000 y 5000.

Los pesos moleculares inferiores y superiores no son tan adecuados. Las soluciones acuosas de polietilenglicol mencionadas se agregan hasta una concentración final del 15-40% preferentemente del 18-30%. El sedimento que se forma se centrifuga, a la solución clara, que sobrenada, se le agrega más solución de polietilenglicol, se vuelve a centrifugar y éste proceso se



27 DIC. 1966

- repite tantas veces como se quiera. Algunos de los precipitados que se obtienen en esta fraccionación contienen principalmente material biológicamente activo, además de reducidas cantidades de proteínas inertes. La
5. purificación de los precipitados del polietilenglicol adherido se puede realizar disolviéndolos en agua, liberando la solución de los componentes insolubles y precipitando con un exceso de acetona. La L-asparaginasa se precipita en forma de copos mientras que el polietilenglicol se mantiene en solución. También es posible
10. precipitar con otros disolventes, tales como, por ejemplo, con alcoholes inferiores. Por otra parte se puede extraer el polietilenglicol de la solución del precipitado, además, con aquellos disolventes que no degraden
15. la enzima y que no sean hidromiscibles, por ejemplo, con diisopropiléter. Del precipitado disuelto es posible extraer el polietilenglicol, cuyo peso molecular no debe sobrepasar la cifra de 10.000, mediante diálisis y obtener la enzima mediante liofilización de las partes
20. no dializables. Pero también es posible secar el precipitado y extraer entonces con acetona u otros disolventes.

- Convenientemente se realizan estas operaciones a una temperatura que puede encontrarse entre 0 y 44°C.
25. El precipitado de la enzima es independiente del pH de las soluciones acuosas. Se trabaja convenientemente en zonas pH comprendidas entre 4 y 10.

- Para la realización del procedimiento son también adecuados otros poliglicoles, por ejemplo, el polipropilenglicol.
- 30.

27 DIC



Por un equipo de investigación americano, se describió en el año 1967 un procedimiento para el fraccionamiento parcial de suero, o bien de plasma, con polietilenglicol (Fed. Proc. 1967 pág. 3218).

5. El precipitado selectivo de una enzima determinada, tal como por ejemplo de la L-asparaginasa, con soluciones de polietilenglicol, no tiene hasta ahora analogía en la química de las enzimas.

10. La ventaja del nuevo procedimiento, en comparación con los métodos hasta ahora conocidos, por ejemplo, el conocido precipitado con sulfato amónico para el enriquecimiento de la L-asparaginasa consiste en los siguientes puntos:

15. 1. Practicamente se pueden emplear cantidades arbitrarias de asparaginasa en bruto sin disminuir, por ello, los rendimientos.

20. 2. Se trabaja en soluciones acuosas muy concentradas. De esta manera se puede obtener la enzima en forma enriquecida fácilmente por precipitación con disolventes o por liofilización.

3. El polietilenglicol en exceso se puede eliminar fácilmente con disolventes.

25. 4. El procedimiento representa un paso esencial en el camino hacia la obtención de la asparaginasa cristalizada.

El método descrito conduce en dos etapas de precipitación desde la asparaginasa en bruto con aproximadamente 3 hasta 4 U/mg de sustancia a productos con un grado de pureza de 70 hasta 80 U/mg de sustancia.

30. Para la aplicación clínica de la L-asparaginasa es necesario, sin embargo, elevar el grado de pureza



practicamente alcanzable hasta el valor máximo posible. Además, el procedimiento para lograr esta meta deberá poder realizarse a escala técnica.

5. Se ha descubierto ahora igualmente, que se puede mejorar considerablemente la selectividad del precipitado con polietilenglicol si a la solución de L-asparaginasa se le agrega, antes del precipitado, úrea u otras amidas destructoras de enlaces de puente de hidrógeno.

10. De esta solución se precipita la L-asparaginasa solamente bajo concentraciones relativamente altas de unos 150 hasta 200 g de polietilenglicol/litro de solución, mientras que las proteínas inertes y las demás impurezas se precipitan a concentraciones mucho más bajas, y esto a concentraciones idénticas que en la precipitación de solución libre de úrea.

15.

Convenientemente se realiza esta operación a una temperatura que puede encontrarse entre -4 y $+40^{\circ}\text{C}$. El precipitado de la enzima de la solución acuosa es, en el margen pH de 6 hasta 10, independientemente del valor del pH.

20.

La úrea que queda en el sedimento del precipitado de polietilenglicol se puede eliminar, por ejemplo, mediante recogida del sedimento y nueva precipitación ulterior con polietilenglicol.

25.

En lugar de úrea se pueden emplear también otras amidas que destruyan enlaces de puente de hidrógeno, por ejemplo, guanidina, formamida, acetamida y otras amidas hidrosolubles. Sobre el efecto degradador de la úrea y de otras amidas sobre las proteínas se

30.



informa en varios lugares (por ejemplo, J. Biol. Chem. 123 (1938) pág. 543).

La ventaja de la mencionada etapa adicional del procedimiento consiste en lo siguiente:

5. 1. Con dos etapas de precipitación se logra un grado de pureza de la L-asparaginasa como hasta ahora no fue posible en escala técnica.

10. 2. Debido a la propiedad facilitadora de la solución de, por ejemplo, úrea, se puede trabajar en soluciones acuosas más concentradas de L-asparaginasa, con lo que el procedimiento técnico gana considerablemente en sencillez.

15. 3. Los resultados de un precipitado con polietilenglicol se puede reproducir mejor en presencia de, por ejemplo, úrea, a pesar de la constitución variable de las asparaginasa en bruto.

20. 4. El procedimiento representa un avance aún mayor en el camino hacia la obtención de la asparaginasa cristalizada. Con los métodos de la química de las proteínas usuales para ello, por ejemplo mediante precipitación con $Mg SO_4$, $(NH_4)_2 SO_4$, acetona, etc. se logra hacer cristalizar la enzima.

25. Se ha descubierto ahora igualmente que se puede mejorar más aún el grado de pureza de la L-asparaginasa si la enzima, una vez purificada mediante precipitación con polietilenglicol, con una actividad de 100 hasta 150 U/mg de proteína, se somete a precipitación en el punto isoeléctrico de la enzima.

30. En su punto isoeléctrico, cuyo pH es aproximadamente de 4,9, la enzima tiene una solubilidad inferior



que todas las restantes proteínas aún existentes en la solución. Esto conduce a una precipitación en forma de copos de la L-asparaginasa que se puede apoyar mediante adición de cantidades pequeñas de polietilenglicol o de disolventes orgánicos miscibles con agua. Con

5. convenientemente se efectúa esta operación ajustando el valor del pH entre 4,9 y 5,5 aproximadamente y realizando la precipitación a temperaturas bajas.

Las ventajas del procedimiento según la presente invención, en comparación con el método del polietilenglicol solo o modificado como antes se ha mencionado, consisten en lo siguiente:

10.

1) No se necesitan, ó solamente se necesitan pequeñas cantidades de agente de precipitación.

15. 2) Se llega, partiendo de una actividad específica de la L-asparaginasa entre 100 y 150 U/mg de proteína, a una actividad específica de hasta 190 U/mg de proteína.

20. 3) El método suministra el producto de partida para la cristalización de la L-asparaginasa.

En la obtención de preparados de L-asparaginasa, por ejemplo, de E. coli según métodos que han sido descritos por Campbell et al [Biochemistry 6 (1967) Pág. 721 hasta 730, allí ulterior literatura] se arrastran pirógenos de las células del coli al producto final.

25.

Asimismo es posible que durante la elaboración, que en su mayor parte se ha de realizar en agente acuoso, lleguen impurezas a los preparados de L-asparaginasa que actúan pirógenamente. A pesar de muchos esfuerzos, hasta ahora no se ha logrado obtener la L-asparaginasa

27 DIC.



5. libre de pirógenos. Tampoco los métodos usuales para la eliminación de los pirógenos, tales como la filtración a través de capas clarificadoras, métodos de absorción con hidroxilapatita, hidróxido de aluminio, silicatos, además con resinas sintéticas, condujeron a éxito alguno. Tampoco la cromatografía en geles de dextrano sin radicales ionizantes o en dietilaminoetilcelulosa según Campbell tuvo éxito.

10. Se ha descubierto ahora que los pirógenos de los preparados de L-asparaginasa en bruto se pueden eliminar con ayuda de geles dietilaminoetildextrano (DEAE-dextrangel) disolviendo la enzima en soluciones tampones de electrolitos débiles, la solución así obtenida se agrega, o bien según el método cromatográfico a una columna del dextrangel esponjado y equilibrado con el mismo tapón y la L-asparaginasa se fracciona mediante concentración creciente de sal y se eluye, o se mezcla según el método de Batch con el dextrangel, la suspensión se filtra, o se centrifuga, y la enzima ligada al gel se eluye con tampones adecuados de concentración más elevada de sal.

20. En el procedimiento cromatográfico se disuelve el preparado enzimático en bruto en soluciones tampón de concentración 0,02 M aproximadamente, preferentemente disoluciones tampón de acetato amónico o formiato en la zona neutra o debilmente alcalina, aproximadamente a un pH de 7 a 8,5, no debiendo estar demasiado concentrada la solución que se forma. Preferentemente se emplean soluciones al 1 hasta 2% de la enzima.

25. El dextrangel se esponja primeramente en el

30.

27 DIC



mismo tampón y se equilibra cambiando varias veces el tampón. Se llena después en columnas de cromatografía ascendiendo la relación entre diámetro y altura del lecho de 1: 3 a 1: 30. La solución enzimática se vierte sobre la columna elevándose la velocidad de paso de 2 a 4 cc/hora y por cm^2 de sección de la columna. La elución se efectúa con un contenido creciente de sal en la disolución tampón, preferentemente con un aumento lineal; sin embargo, también es posible aumentar escalonadamente la concentración del agente de elución. La enzima se eluye por los iones acetato o concentraciones de 0,08 M y más.

La purificación se puede efectuar también según el procedimiento de Batch vertiendo la solución enzimática al dextragel DEAE esponjado y ajustado el pH a 7,5. La enzima se absorbe por el gel y después de lavar a fondo el gel sobre un filtro a vacío, o con ayuda de una centrífuga, se puede eluir con soluciones de sal de concentración adecuada. La ventaja de este procedimiento, en comparación con el procedimiento de la columna, es que se puede trabajar en forma sencilla con grandes cantidades. El inconveniente consiste en que la separación de las sustancias contaminantes es menos rigurosa y en que se necesita una cantidad mayor de líquido para la elución.

El aislamiento de la L-asparaginasa de la solución en forma sólida se puede realizar según métodos conocidos, por ejemplo, la liofilización, en caso dado después diálisis o mediante precipitación con polietilenglicol o acetona.

Según el procedimiento de la presente invención



se obtienen, partiendo de preparados con aproximadamente 20 hasta 100 U/mg, preparados puros con 180 hasta 220 U/mg de proteína que están libres de productos pirógenos contaminantes. Estos preparados son adecuados para su aplicación en la quimioterapia.

5. Otro método para separar eficazmente la L-asparaginasa de los pirógenos consiste en calentar la solución enzimática, preferentemente en una concentración de 0,5 - 15%, en presencia de un aminoácido, con un pH entre 7,0 y 9,2, preferentemente entre 8 y 9, a 40 hasta 61°C, liberar la solución de los productos acompañantes precipitados y a continuación efectuar un precipitado con un pH 4,5 hasta 5,5 con solución de polietilenglicol.

10. Para la realización del procedimiento según la presente invención se le agregan a las soluciones al 0,5 hasta 15% de L-asparaginasa con aminoácido, preferentemente glicerina, en cantidades de 1 hasta 10%, a temperaturas de -10 hasta +65°C. El pH de ésta solución se ajusta entre 8 y 9. Convenientemente se mantiene la solución entonces a +50°C durante 1 hasta 5 días. La solución sobrenadante se ajusta a un pH de 5,2 y se precipita con polietilenglicol. El material así obtenido se compone de L-asparaginasa enriquecida, libre de pirógeno o bien pobre de pirógeno.

15. Este procedimiento ofrece las siguientes ventajas:

1. Los pirógenos se pueden separar con más seguridad que por los métodos hasta ahora conocidos,
2. Simultáneamente con la eliminación de los

20.

25.

30.

27 DIC. 1968

pirógenos se aumenta considerablemente la actividad específica de la enzima L-asparaginasa.

- También otro procedimiento para la obtención de L-asparaginasa libre de pirógeno aprovecha el efecto estabilizador de la glicina debido a que en este procedimiento la enzima se calienta en presencia de un aminoácido, especialmente de glicina, y de un alcohol alifático inferior, preferentemente metanol, con un pH entre 7,0 y 9,2 a 40 hasta 61°C, la solución se libera de las sustancias acompañantes precipitadas y a continuación se efectúa un precipitado a un pH de 4,5 hasta 5,5 con solución de polietilenglicol. Una adición de un 4 hasta 40%, preferentemente 10%, de un alcohol alifático inferior, preferentemente metanol, conduce a una amplia desnaturalización de las proteínas extrañas.
- 5.
- 10.
- 15.

- Este procedimiento ofrece la posibilidad de eliminar las proteínas acompañantes inertes de la L-asparaginasa, de difícil eliminación, a las que se les adscribe un elevado efecto antigénico. Para la realización de este procedimiento según la presente invención se disuelven las L-asparaginasas, preferentemente aquellas que con polietilenglicol se han purificado hasta un grado de unas 160 hasta 220 U/mg, en una solución acuosa al 0,5 hasta 15%. Se agregan, por ejemplo, 10% en volumen de metanol y unos 3% en peso de glicina. El pH se ajusta a 8 hasta 9. Convenientemente se mantiene entonces la solución durante 1 hasta 5 días a 45°C. La solución sobrenadante se ajusta a un pH 5,2 y se precipita con polietilenglicol. El material así obtenido se compone de L-asparaginasa enriquecida, libre de pirógenos o
- 20.
- 25.
- 30.



pobre en pirógenos.

La L-asparaginasa en bruto empleada como producto de partida se obtiene como sigue:

- Solución acuosa al 10% de hinchamiento de maiz,
5. (referido a la sustancia en seco) se ajusta con potasa cáustica 2-N a un pH de 7,0, se calienta durante 20 minutos a 120°C y después de enfriar se clarifica, en la centrifugadora de rebose. 30 litros de esta solución acuosa de esponjamiento de maiz, clara se diluye con
10. 170 litros de agua de la red. Después de agregar y disolver 1,20 kg de lactato sódico y 400 g de sulfato amónico se esteriliza el caldo de cultivo obtenido, en un fermentador, durante 40 minutos a 110°C, a continuación se enfría y después se inyecta con 500 cc de un cultivo
15. de agitación, desarrollado en un caldo de cultivo durante 18 horas a 30°C, de Escherichia coli ATCC 9637. El preparado de fermentación se airea a 30°C con 80 litros de aire/minuto a 150 revoluciones del mecanismo agitador por minuto. Después de un tiempo de desarrollo de
20. 17 horas, se separan las bacterias, que contienen la L-asparaginasa, en una centrifugadora de rebose y se vuelven a suspender en 20 litros de agua destilada. En esta suspensión se vierten, agitando, 80 litros de acetona, las bacterias precipitadas en forma de copos se separan
25. en la centrifugadora de rebose y la masa celulosa se vuelve a suspender en 20 litros de agua destilada. Para extraer la L-asparaginasa de las células de bacterias, se agita la suspensión durante 4,5 horas a 30°C. Durante este tiempo se mantiene el pH entre 7,5 y 7,8 mediante
30. adiciones de sosa cáustica 1 N. Mediante separación



- en la centrífuga de rebose de las células de bacterias extraídas se obtienen aproximadamente 17 litros de una solución clara, de la que, además de otros productos contenidos en la célula, se precipita la L-asparaginasa mediante adición de 68 litros de acetona. El precipitado formado se aísla, se lava ulteriormente con acetona y se seca en vacío a 25 hasta 30°C. La L-asparaginasa en bruto, así obtenida, tiene una actividad enzimática de aproximadamente 100 unidades (unidades de 30 minutos) por mg.

10.

El producto de partida así obtenido se puede, en caso dado, purificar previamente como sigue:

15.

50 g de asparaginasa en bruto con una actividad de 100 unidades/mg se disuelven en 100 cc un tampón m/15 con un pH de 8,5, bajo agitación, a temperatura ambiente. La solución se calienta, en porciones de 100 cc cada una, en el baño María durante 15 minutos a 59,5°C con lo que se presenta una fuerte formación de copos de

20.

proteínas inactivas, mientras que la enzima se mantiene invariable en solución. Los preparados de degradación, reunidos, se enfrían y se centrifugan a 6000 rpm hasta estar claros. La solución posee una actividad específica de 200 - 300 U/mg de proteína. Esta se denomina aquí como solución A. La solución A se puede fraccionar, según

25.

el fraccionamiento conocido de las enzimas diluyentes (Biochem. J. 48,42-48 (1951)), con acetona, con lo que la L-asparaginasa queda en el precipitado que se obtiene al ajustar la solución de un 30 a un 50% de acetona. De esta manera se obtienen preparados con aproximadamente

30.

500 U/mg.



En el procedimiento según la presente invención se puede partir, o bien de una asparaginasa en bruto con aproximadamente 100 U/mg. o de un preparado enriquecido. Especialmente conveniente, como producto de partida para el fraccionamiento con polietilenglicol, ha demostrado ser la solución A o la L-asparaginasa que se obtiene de ella por fraccionamiento con acetona.

Los límites de fraccionamiento no son constantes ya que dependen de la clase de las impurezas. Sin embargo, mediante un simple ensayo previo es posible determinar estos límites.



Ejemplos: Precipitación con polialquilenglicol:

EJEMPLO 1

- 1000 cc de solución A (obtenida de 50 g de L-asparaginasa en bruto con una actividad de 112 U/mg) se enfrían a 3°C y se mezcla con 500 cc de solución al 50 % de polietilenglicol. El sedimento se recogió por centrifugación. La L-asparaginasa obtenida recibe la denominación "fracción 1". De la solución sobrenadante de la fracción 1 (1468 cc) se precipitó con 100 cc de solución al 50 % de polietilenglicol, más material que se elaboró. Precipitado: fracción 2. La solución sobrenadante de la fracción 2 (1550 cc) se mezcló nuevamente con 100 cc de solución de polietilenglicol y se elaboró. Precipitado = fracción 3. En forma análoga se obtuvo la fracción 4. Los grados de pureza y rendimientos logrados con éste fraccionamiento se desprenden de la tabla siguiente

20.	Fracción No	Rendimiento en gr.	U/mg	% de unidades referido a la asparaginasa en bruto empleada.
	1	1,46	230	6
	2	2,43	1050	43
25.	3	1,40	1240	29
	4	0,64	310	4

EJEMPLO 2

- 100 g de asparaginasa en bruto con 103 U/mg se disolvieron en 2 litros de agua y se clarificó por centrifugación. La solución se ajustó con solución



1H de KOH a un pH de 8,5 y se fraccionó con solución de polietilenglicol en forma análoga a la del ejemplo 1. Las fracciones 2 y 3 así obtenidas se reunieron. Rendimiento 12,0 g

5.	Unidades /mg	765
	Rendimiento referido a las unidades empleadas	
		88 % de la teoría

EJEMPLO 3

10. Los sedimentos reunidos de las fracciones 2 y 3 obtenidas en el ejemplo 2 se disolvieron en 400 cc de agua y nuevamente se sometió a un fraccionamiento con solución de polietilenglicol. Los sedimentos así obtenidos de la fracción 2 y 3 se dispersaron dos veces en acetona seca, intensamente enfriada, se centrifugaron, se lavaron en agua, se filtraron sobre una capa de K3 de Seitz y se liofilizó.

15.	Rendimiento	4,40 g
	Unidades/mg	1730
20.	Rendimiento referido a 100 g de asparaginasa en bruto	
		74 %

EJEMPLO 4

25. 5,0 g de L-asparaginasa previamente purificada de la solución A mediante fraccionamiento con acetona, con 576 U/mg se disolvieron en 100 cc de agua y se fraccionó con solución de polietilenglicol como se ha descrito en el ejemplo 1. Los grados de pureza

30. logrados con éste fraccionamiento y los rendimientos



se desprenden de la tabla siguiente:

Fracción No	Rendimiento en gr.	U/mg	% de unidades refe- rido a la asparagi- nasa en bruto em- pleado
----------------	-----------------------	------	---

5.

1	1,381	790	38
2	0,362	1930	24
3	0,155	640	3
4	1,00	180	6

10.

Adición de úrea u otras amidas:

EJEMPLO 5

- 5 kg de asparaginasa en bruto (obtenida en la forma descrita) se introducen a temperatura ambiente en 40 litros de agua destilada. El valor del pH de la solución que se forma lentamente, se ajusta con unos 1,5 litros de NaOH 1-N entre 8,5 y 8,9. Después se agrega la úrea hasta una concentración de aproximadamente 3 mol/litro. La temperatura de la solución desciende entonces unos 10°C. Se agita aún durante 1 hora y la solución que se forma se deja reposar entre 16 y 24 horas a 4°C. Después de éste tiempo se precipita la fracción I mediante adición de 25 a 30 litros de una solución al 50 % de polietilenglicol. La fracción I se tira. La fracción II se precipita mediante adición de otros 15 litros de solución al 50 % de polietilenglicol. La fracción II tiene la actividad principal. Mediante la adición de otros 15 litros de solución de polietilenglicol al residuo de la fracción II se obtienen la fracción III que contiene aproximadamente de un 20 hasta un 25 % de la actividad de asparaginasa preparada.



La fracción II se recoge en unos 2,5 litros de agua destilada . Mediante adición de 250 cc de una solución al 50 % de polietilenglicol se precipita la fracción Ia; mediante ulterior adición de 250 cc de solución de polietilenglicol la fracción IIa. En igual forma se obtienen las fracciones IIIa y IVa. Los grados de pureza y rendimientos logrados con éste fraccionamiento se desprenden de la tabla siguiente:

Fracción	Rendimiento	U/mg (unidades de 1 minuto.	% de la actividad enzimática, referido a la asparaginasa en bruto empleada
Nº	en gr.		
I a	1,6	19,4	0,3
II a	8,1	100,0	8,0
III a	23,0	144,0	31,2
IV a	16,2	74,0	11,5
V a	18,9	25,0	4,6
			55,6

20.

EJEMPLO 6

Se procede como en el ejemplo 5 pero la concentración en úrea se aumenta a aproximadamente 6 mol/litro. El tiempo de reposo de la solución a continuación asciende aquí sólo a 2 horas. Los rendimientos concuerdan ampliamente con los del ejemplo 5.

25.

EJEMPLO 7

Se procede como en el ejemplo 5 pero, en lugar de úrea, se agrega hidrocloreuro de guanidina hasta

30.



una concentración de 2 moles/litro aproximadamente. El tiempo de residencia de la solución asciende a 2 horas. Los rendimientos corresponden a los del ejemplo 5.

Precipitación en el punto isoeléctrico:

5. EJEMPLO 8

100 g de L-asparaginasa con una actividad específica de aproximadamente 100 U/mg de proteína se disuelven en 1000 cc de agua destilada a temperatura ambiente. Durante el proceso de solución se ajusta el valor del pH con NaOH 1-N entre 8,5 y 8,9. La parte insoluble, que queda entonces, se separa por centrifugación durante 10 minutos a 6000 rpm. El valor del pH de la parte sobrenadante clara se ajusta en el baño de hielo lentamente a un pH entre 7 y 6,8. El sedimento olenginoso, que se precipita entonces, se separa por centrifugación durante 25 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante claro de ésta centrifugación se ajusta con HCl 1-N a un pH de 5,3. Después se agregan, en porciones de 25 cc cada una una solución al 50 % de polietilenglicol y se separan cada vez durante 10 minutos por centrifugación a 6000 rpm. Se obtienen de ésta manera entre 5 y 6 fracciones, encontrándose la actividad principal con la máxima actividad específica entre las fracciones 3 a 5.

25. Rendimiento: 60 hasta 70 %.

EJEMPLO 9

Se procede como en el ejemplo 8 pero en lugar de polietilenglicol se agrega acetona fría en 4 etapas hasta un 20 % del volumen de la solución. Los rendimientos son similares a los del ejemplo 8.

EJEMPLO 10

Se procede como en el ejemplo 8 pero en lugar de polietilenglicol se emplea alcohol etílico en 5 etapas hasta un 20 % del volumen de la solución. Los rendimientos son similares a los del ejemplo 8.

5. EJEMPLO 11

100 g de L-asparaginasa con una actividad específica de 140 U/mg de proteínas se disuelven en 500 cc de agua. El pH de la solución se ajusta con NaOH 1-N a 8,5. La sustancia que se mantiene insoluble se separa por centrifugación durante 15 minutos a 6000 rpm. El pH de la solución clara se ajusta, a 4°C y con HCl 1-N, a un valor de 6,8 y el precipitado que formado se separa por centrifugación. El sobrenadante claro se ajusta después de la centrifugación con HCl 1-N lentamente a un pH de 5,0 a 5,1 y se deja durante varias horas a 4°C. El precipitado que se presenta entonces se separa por centrifugación, Este contiene la L-asparaginasa con un rendimiento del 60 hasta el 80 % de la actividad empleada y con una actividad específica máxima de hasta 190 U/mg de proteínas.

Obtención de L-asparaginasa cristalizada:

EJEMPLO 12

200 g de asparaginasa en bruto con una actividad de 97 U/mg se disuelven en 4000 cc de solución tampón de glicocol, pH 8,5 "Biochemisches Taschenbuch" Manual bioquímico pág. 91, 1964) y, en porciones, se calienta durante 30 minutos a 60°C. Se precipita así en forma de copos la proteína inactiva mientras que en la enzima se mantiene inalterada en solución, El preparado se centrifuga a 6000 rpm hasta estar claro y se fracciona con acetona. La parte que se precipita al agre



27 016.144

5. gar de un 40 hasta un 45 % de acetona asciende a 16,4 g. Esta contiene 863 U/mg. 9,3 g de ésta asparaginasa enriquecida se disuelven en 190 cc de solución 3-molar de úrea, se ajusta con sosa cáustica a un pH de 8,5 y se fracciona con polietilenglicol (solución acuosa al 50 %). La fracción que se obtiene después de agregar de 22 a 30 cc se elabora de modo usual. Rendimiento 2,1 g; U/mg: 3130.

10. Una solución de 4,0 g de ésta muestra en 40 cc de agua bidestilada se ajusta con ácido clor - hídrico 1-N a un pH de 5,2 y se fracciona con solución de polietilenglicol.

15. La parte que se obtiene después de agregar de 12,5 a 15 cc, se centrifuga después de reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente y después de reposar durante 2 horas bajo acetona se lava con más acetona.

Rendimiento: 1,2 g; U/mg; 6110.

20. Prismas planos, Teñidos de marrón a 225°C, sinterización a partir de 260°C, espumado a partir de 270°C y descomposición total a partir de 274°C.

25. Los cristales así obtenidos se recristalizan en soluciones acuosas mediante adición de disolventes orgánicos, tales como acetona o alcohol, o mediante adición de polietilenglicol.

Los cristales muestran los siguientes resultados de análisis:

27 DIC. 1968

Contenido en agua: 12,5 %

5. (La determinación del contenido del agua se efectuó hirviendo durante 6 horas en al to vacío a 110° en una pistola de secado especial según J. Unterzaucher [Mikrochem 18, 315 (1935)]. La constancia de peso se determinó mediante un secado continuado).

10. Residuo de recocado: 0,11 %

(La determinación del contenido de cenizas de proteínas se efectúa según F. Pregl y H. Roth (Microanálisis orgánico cuantitativo, pág. 174, Springer, Wien (1949)).

15. Contenido de Proteínas: 88,0 %

(La determinación de las proteínas se efectuó después de la precipitación con ácido tricloroacético según el método BIURET (T.E. Weiselbaum, Am. J. Clin. Path. (Techn. Sec.) 10, 40 (1946)).
Volumen total: 4 cc (de ellos 2 cc reactivo de BIURET):

25. $E_{1\text{ cm}}^{546\text{ m}\mu} \cdot 12,3 = \text{mg proteínas/cc de solución de ensayo.}$

La constante de sedimentación mostró un valor de $S_{20}^{1\%} = 4,33$.

30. La figura 1 muestra el espectro infrarrojo



C. 1936

de la L-asparaginasa cristalizada, ~~recogidas~~ según la técnica KBr.

5. En la figura 2 se muestra el espectro ultravioleta del preparado.

Aparato de medición: Zeiss Spectralfotómetro PMQ II (amplificación 1/1/I).

Grosor de capa: 1 cm

Concentración: cada vez 1 mg H₂O y preparado libre de sal por cc.

10. Como disolvente sirvió una solución tampón de fosfato con un pH 7 (Merck Titrisol) Nr. 9887.

La figura 3 es una reproducción de las fotografías de los cristales de la L-asparaginasa.

Separación de los pirógenos:

15. EJEMPLO 13

30 g de DEAE-dextragel (gel de dietilaminoetil-dextrano = DEAE Sephadex A 50^R, producto comercial de la Aktielbolaget Pharmacia, Uppsala, Suecia) se trata previamente en la forma usual, se equilibran con 0,02 moles glicina, 0,02 moles de disolución tampón de formiato amónico de pH 7,8 y se introduce en una columna de 3,2cm de diámetro. Altura del lecho: 90 cm. 500 mg de L-asparaginasa en bruto con 100 U/mg se disuelven en 50 cc del tampón de arriba y se aplica

25. sobre la columna. A continuación se eluye la enzima con un gradiente lineal de 2 litros de la disolución, tampón anterior a 2 litros de 0,02 moles de glicina, 1 mol de formiato amoniac, pH 7,5. Las fracciones que contienen la asparaginasa se reúnen y se liofilizan.

30. Rendimiento: 1,03 g con 27.800 U = 83 % de la acti-



C. 1900

vidad insertada. La actividad específica, referida a la proteína, asciende a 210 U/mg.

5. Ensayo pirógeno en conejos: A 5 conejos se les dosificaron 200 U/kg. El valor medio del aumento de la temperatura ascendió a 0,48°C.

La sustancia de partida mostró bajo las mismas condiciones un aumento de temperatura en 1,6°C.

EJEMPLO 14

10. 30 g de DEAE-dextragel se tratan previamente en la forma usual y se equilibra con 0,05 moles de acetato amónico pH 7,5 y se introduce en una columna con 3,2 cm de diámetro. Altura del lecho: 95 cm. 500 mg de L-asparaginasa en bruto con 39,7 U/mg se disuelven en 50 cc de 0,05 moles de acetato amónico pH 7,5 y se aplica sobre la columna. La elución se efectúa con un gradiente lineal de 2 litros de 0,05 moles de acetato amónico pH 7,5 a 2 litros de 1 mol de acetato amónico pH 7,5. Las fracciones que contiene la asparaginasa se reunen. Rendimiento: 18.600 U = 94 % de la actividad insertada. Actividad específica: 200 U/mg de proteína.
- 15.
- 20.

Ensayo de pirógenos en los conejos: Con 300 U/kg por animal ascendió el valor medio del aumento de la temperatura a 0,4°C.

25. La sustancia de partida mostró a 200 U/kg de animal un aumento de temperatura en 1,6°C.

Como comparación sea mencionado un ensayo de purificación con dietilaminoetilcelulosa:

30. 30 g de DEAE-celulosa se equilibran con 0,05 moles de acetato amónico pH 7,5 y se introducen en una columna. 500 mg de L-asparaginasa en bruto



- (34 U/mg) se disuelven en 50 cc de la disolución tampón anterior, se aplica sobre la columna y se eluye con un gradiente lineal 1 litro de 0,05 acetato amónico pH 7,5 a 1 litro 0,5 moles de acetato amónico pH 7,5.
5. Rendimiento: 14.000 U = 82 % de la actividad con 89 U/mg de proteína.
- Ensayo de pirógenos en los conejos: A 200 U/kg animal ascendió el valor medio del aumento de la temperatura a 1,0°C.
10. La sustancia de partida mostró, bajo las mismas condiciones, un aumento de la temperatura en 1,8°C.
- Tampoco otras condiciones de ensayo dieron una eliminación más amplia de los pirógenos, de lo cual se desprende claramente la superioridad del procedimiento según la presente invención.
15. EJEMPLO 15
- 490 g de DEAE-dextragel se tratan previamente con la forma usual y se equilibran con 0,05 moles de acetato amónico pH 7,5, al que se le agregó mertiolato en una concentración de 20 mg/litro. La suspensión se introdujo en una columna enfriada a 4°C con un diámetro de 20 cm.
20. Altura del lecho: 65 cm. 9,8 g de una asparaginasa en bruto con 46 U/mg se disolvieron en 880 cc de 0,02 moles de acetato amónico pH 7,5 y se agregó a la columna. La elución con el gradiente lineal de 10 litros de 0,05 moles de acetato amónico pH 7,5 a 10
25. litros de 0,5 moles de acetato amónico pH 7,5. Las frac
- 30.



DIC. 1968

ciones que contienen la asparaginasa se reunieron.

Rendimiento: 365.000 U = 81 % de la cantidad insertada.

5. Ensayo de pirógenos específicos en el conejo: Con 200 U/kg animal ascendió el valor promedio del aumento de la temperatura a 0,33°C.

Las sustancias de partida mostró bajo las mismas condiciones un aumento de la temperatura en 1,80°C.

10. EJEMPLO 16

A 10 g DEAE-dextragel, equilibrada con 0,05 moles de solución de acetato amónico pH 7,5 se agrega una solución de 100 mg de L-asparaginasa con 39,7 U/mg en 100 cc de solución 0,05 moles. acetato amónico pH 7,5. El preparado se agita durante 15 minutos y después se aspira. El residuo se eluye consecutivamente con disoluciones tampón de electrolitos de diferente fuerza (véase tabla). Las partes de L-asparaginasa eluidas ya bajo electrolitos débiles contienen pirógenos mientras que las partes eluidas con disoluciones tampón más fuertes están libres de pirógeno. Los rendimientos se aprecian en la tabla.

25.	Tampón	Actividad U	Rendimiento %	Pirogenidad T/animal (°C)
	Acetato amónico 0,05 M pH 7,5	5010	24	1,1
	Acetato amónico 0,10 M pH 7,5	3820	18	1,2
	Acetato amónico 0,20 M pH 7,5	7850	37	0,9
	Acetato amónico 0,40 M pH 7,5	4060	19	0,3
	Acetato amónico 0,80 M pH 7,5	520	2	0,3



EJEMPLO 17

5. 100 g de asparaginasa con una actividad específica de 100 U/mg se disuelven en 1 litro de agua. Se agregan aproximadamente 40 g de glicina y la solución se ajusta a un pH de 8,9. La solución se mantiene 90 horas a +50°C y la proteína que entonces se precipita se centrifuga durante 20 minutos a 6000 rpm. El centrifugado claro se ajusta con HCl 2-N a un pH de 5,2 y se precipita fraccionadamente con solución
10. al 50 % de polietilenglicol. La parte que se precipita después de agregar unos 200 cc de polietilenglicol se separa por centrifugación, se lava con acetona y se seca.

15. Rendimiento: unos 35 g con 200 hasta 220 U/mg de sustancia.

De la figura 4 adjunta se desprende el contenido mínimo de pirógenos del producto.

EJEMPLO 18

20. Se procede como en el ejemplo 17 pero la solución de la L-asparaginasa se calienta durante 24 horas a 60°C.

EJEMPLO 19

Se procede como en el ejemplo 17, el pH de la solución se ajusta sin embargo a 8,2.

25. EJEMPLO 20

Se procede como en el ejemplo 18 pero solamente se agregan 20 g de glicina a la solución de la L-asparaginasa.

EJEMPLO 21

30. 100 m de L-asparaginasa con una actividad



- específica de 100 U/mg se disuelven en 1 litro de agua. Se agregan 100 cc de metanol y 40 g de glicina y la solución se ajusta a un pH de 8,9. La solución se mantiene 90 horas a +50°C y la proteína que entonces se precipita se centrifuga durante 20 minutos a 6000 rpm. El centrifugado claro se ajusta con HCl 2-N a un pH de 5,2 y se precipita fraccionadamente con solución al 50 % de polietilenglicol. La parte que se precipita después de agregar unos 200 cc de polietilenglicol se separa por centrifugación, se lava con acetona y se seca.
- 5.
- 10.

Rendimiento: unos 33 g con 200 hasta 235 U/mg de sustancia.

EJEMPLO 22

15. Se procede como en el ejemplo 21 pero se agregan 200 cc de metanol.

EJEMPLO 23

Se procede como en el ejemplo 21 pero a la solución se le agregan 100 cc de etanol.



Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son sus-

5. susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a solicitudes de Patente, presentadas en Alemania, con números y fechas siguientes: P 16 42 615.6 de 27 de diciembre de 1.967, P 17 67 157.8 de 6 de abril de 1.968, P 17 67 158.8
10. de 6 de abril de 1.968, P 17 67 389.1 de 6 de mayo de 1.968, P 17 92 043.3 de 16 de julio de 1.968, y P 18 08 042.7 de 9 de noviembre de 1.968, siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita una Patente de Invención por 20 años, en España, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION
15. DE L-ASPARAGINASA ENRIQUECIDA CRISTALIZADA"; caracterizándose por lo siguiente:

- 1ª.- Procedimiento para la obtención de L-asparaginasa enriquecida cristalizada, caracterizado porque, preferentemente después de separar los pirógenos las soluciones acuosas en bruto
20. de L-asparaginasa, en caso dado después de adicionar úreas u otras amidas rompedoras de los enlaces por puente de hidrógeno, se mezclan con polialquilenglicol y los precipitados así obtenidos, que contienen la L-asparaginasa, se aíslan y, en caso dado, se siguen purificando.

- 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque las soluciones acuosas en bruto de L-asparaginasa se mezclan con polialquilenglicol y los precipitados que
25. contienen L-asparaginasa, así obtenidos, se aíslan y en caso dado se siguen limpiando.

- 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª ó 2ª, caracterizado porque se emplea polietilenglicol ó polipropilenglicol, preferentemente con un peso molecular hasta un máximo
- 30.



entre 1000 y 5000.

4^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 3, caracterizado porque la concentración en polialquilenglicol en la solución de precipitación se encuentra entre 40 y 60 % en peso.

5. 5^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 4, caracterizado porque la precipitación se efectúa a un pH entre 4 y 100.

10. 6^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizado porque los precipitados que contienen L-asparaginasa, obtenidos por precipitación con polialquilenglicol, se disuelven en agua, se separan los componentes insolubles y con acetona o alcoholes inferiores se efectúa de nuevo la precipitación de L-asparaginasa.

15. 7^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizado porque los precipitados que contienen L-asparaginasa, obtenidos por precipitación con polialquilenglicol, se disuelven en agua, se separan los componentes insolubles, el polialquilenglicol contenido en la solución se extrae con aquellos disolventes que no desnaturalicen la enzima y que no sean miscibles con agua, o bien por diálisis, y la L-asparaginasa se obtiene por liofilización de la solución acuosa.

20. 8^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizado porque los precipitados que contienen L-asparaginasa, obtenidos por precipitación con polialquilenglicol, se secan y se extraen con acetona u otros disolventes.

25. 30.



5. 9ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 8, caracterizado porque a las soluciones acuosas en bruto de L-asparaginasa se le agregan úrea u otras amidas rompedoras de enlaces por puente de hidrógeno y después se precipita con polietilenglicol.

10ª.- Procedimiento según la reivindicación 9ª, caracterizado porque como otras amidas que rompen los enlaces por puente de hidrógeno se emplea hidrocloreuro de guanidina, formamida o acetamida.

10. 11ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 5, 9 ó 10, caracterizado porque la enzima previamente purificada mediante precipitación con polietilenglicol a una actividad de 100 hasta 150 U/mg se somete a una precipitación en el punto isoelectrico de la enzima, especialmente a un pH de 4,9-5,5.

15. 12ª.- Procedimiento según la reivindicación 11ª, caracterizado porque la precipitación se apoya con reducidas cantidades de polietilenglicol.

20. 13ª.- Procedimiento según la reivindicación 11ª, caracterizado porque la precipitación se apoya con disolventes orgánicos miscibles en agua.

25. 14ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado porque las soluciones de elevado porcentaje de una L-asparaginasa previamente purificada se somete a una precipitación en el punto isoeléctrico de la enzima.

30. 15ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 14, caracterizado porque la separación de los pirógenos la enzima se disuelve en solu-



5. ciones tampón de electrolitos débiles, la solución - así obtenida, se agrega a una columna de gel de dietilaminoetildextrano esponjado y equilibrado con la misma solución tampón, la enzima se fracciona mediante - concentración creciente de sal y se eluye.

10. 16ª.- Procedimiento según la reivindicación 15ª, caracterizado porque la solución obtenida se mezcla con gel de dietilaminoetildextrano, la suspensión se filtra o se centrifuga y la enzima ligada al gel - se eluye con soluciones tampón de concentración más - elevada de sal.

15. 17ª.- Procedimiento según la reivindicación 15ª, caracterizado porque para el procedimiento cromatográfico el preparado enzimático en bruto se disuelve en soluciones tampón de concentración 0,02 M aproximadamente, preferentemente disoluciones tampón de acetato amónico o formiato en la zona neutra o débilmente alcalina, aproximadamente a un pH de 7 a 8,5, - en concentraciones de preferentemente 1 - 2 %.

20. 18ª.- Procedimiento según la reivindicación - 15ª, 16ª ó 17ª, caracterizado porque en las columnas de cromatografía la proporción entre diámetro y altura de lecho asciende a 1 : 3 hasta 1 : 30 y la velocidad de paso asciende a 2 hasta 4 cc/hora y por cm² de sección de la columna.

25. 19ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 15ª hasta 18ª, caracterizado porque se eluye con iones de acetato de la concentración mínima de 0,08 M.

30. 20ª.- Procedimiento según la reivindicación



15ª, caracterizado porque la suspensión de gel de dietilaminoetildextrano se ajusta en la solución de L-asparaginasa a un pH de 7,5.

5. 21ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 14, caracterizado porque para la separación de los pirógenos la solución de enzimas, preferentemente en una concentración de 0,5 - 15 %, se calienta, en presencia de un aminoácido, preferentemente glicina, con un pH entre 7,0 y 9,2, preferentemente entre 8 y 9, a 40 hasta 61°C, la solución se libera de los productos acompañantes precipitados y a continuación se efectúa una precipitación a un pH de 4,5 hasta 5,5 con solución de polietilenglicol.

10. 22ª.- Procedimiento según la reivindicación 21ª, caracterizado porque el aminoácido se adiciona en una concentración de 1 hasta 10 %.

15. 23ª.- Procedimiento según la reivindicación 21ª ó 22ª, caracterizado porque la solución mezclada con el aminoácido se mantiene durante 1 hasta 5 días, a una temperatura de 50 hasta 61°C.

20. 24ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 14, caracterizado porque para la separación de los pirógenos, la enzima se calienta en presencia de un aminoácido, especialmente de glicina, y de un alcohol alifático inferior, preferentemente metanol, con un pH entre 7,0 y 9,2 a 40 hasta 61°C, la solución se libera de los productos acompañantes precipitados y a continuación se efectúa una precipitación con un pH de 4,5 hasta 5,5 con solución de polietilenglicol.
25. 30.



5. 25ª.- Procedimiento según la reivindicación 24ª, caracterizado porque los preparados de L-asparaginasa, que preferentemente se han llevado con polietilenglicol hasta un grado de pureza de unos 160 hasta 220 U/mg se mezcla en solución acuosa al 0,5 hasta 15 % con aproximadamente 3 % en peso de glicina y 4 - hasta 40, especialmente 10 % del alcohol inferior.

10. 26ª.- Procedimiento según la reivindicación 24ª ó 25ª, caracterizado porque el pH se ajusta a 8 hasta 9 y la solución se calienta a + 50°C y se mantiene durante 1 hasta 5 días a ésta temperatura.

15. 27ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 24ª hasta 26ª, caracterizado porque la precipitación con polietilenglicol se efectúa a un pH de 5,2.

20. 28ª.- Procedimiento para la obtención de L-asparaginasa enriquecida cristalizada; tal y como queda sustancialmente descrita en la presente memoria.

Esta memoria consta de treinta y cinco hojas escritas a máquina, por una sola cara.

Madrid,

27 DIC. 1968

FABRIK FARBEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

A GOMEZ ACEBO Y NOBEN
Asesores Firmados F. Hernández Esté

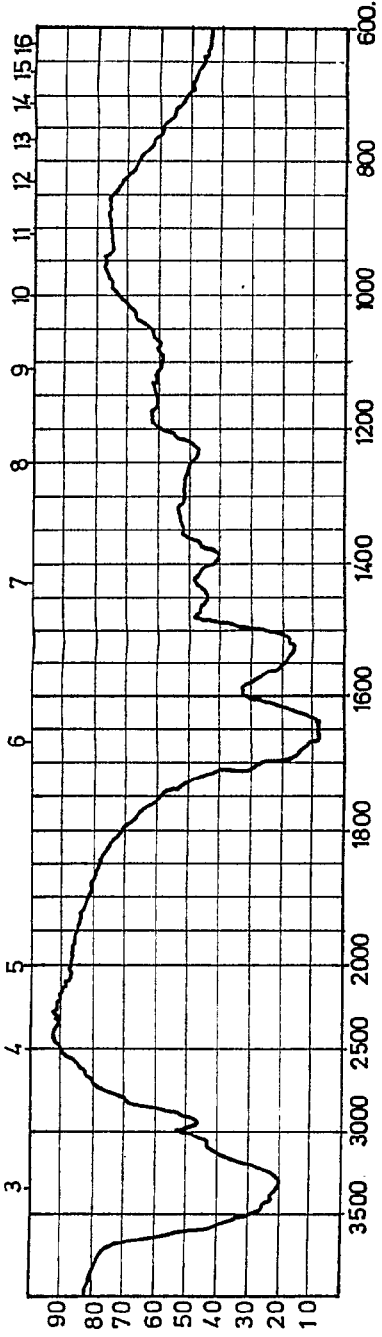
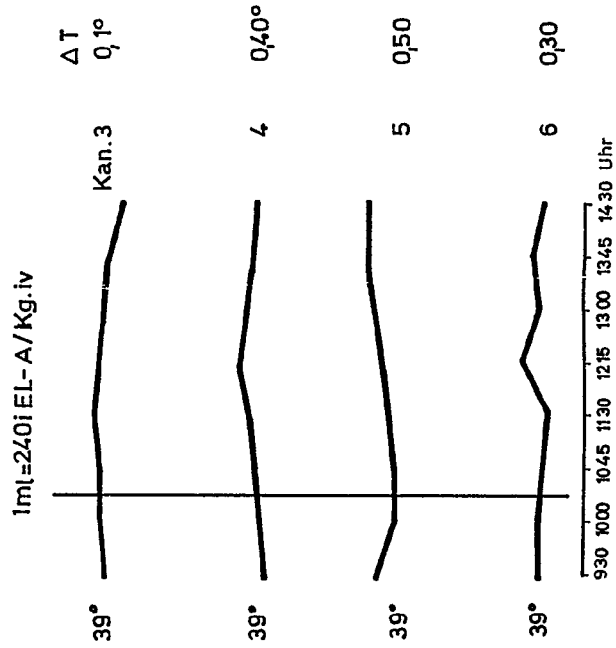
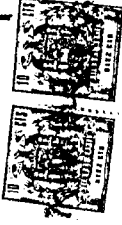


FIG.1



1ml=240i EL- A / Kg. iv

DAB = 051

FIG.4

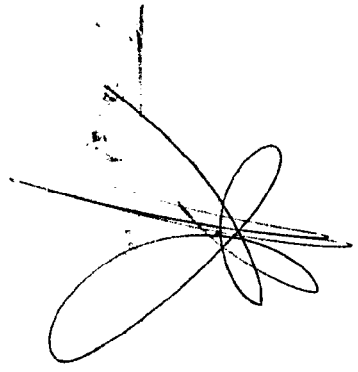


FIG.1

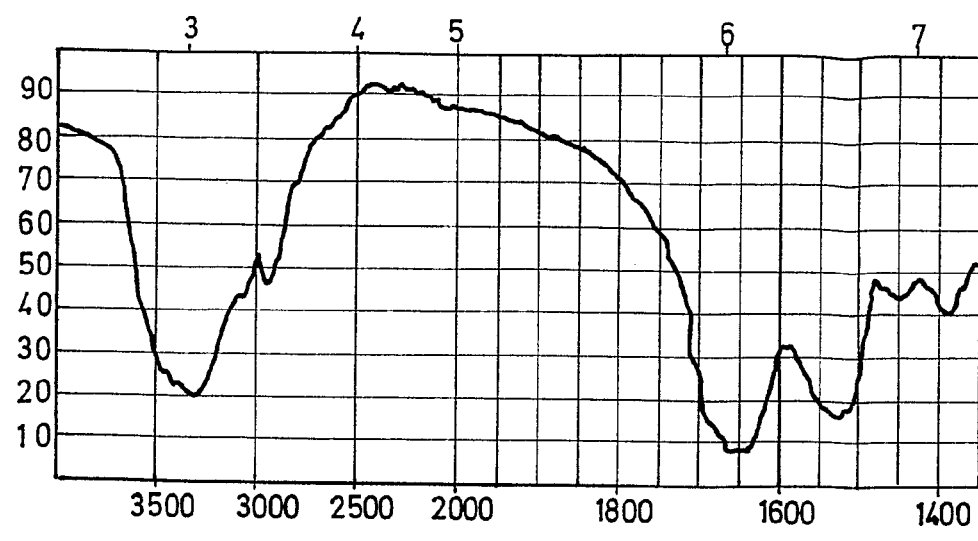
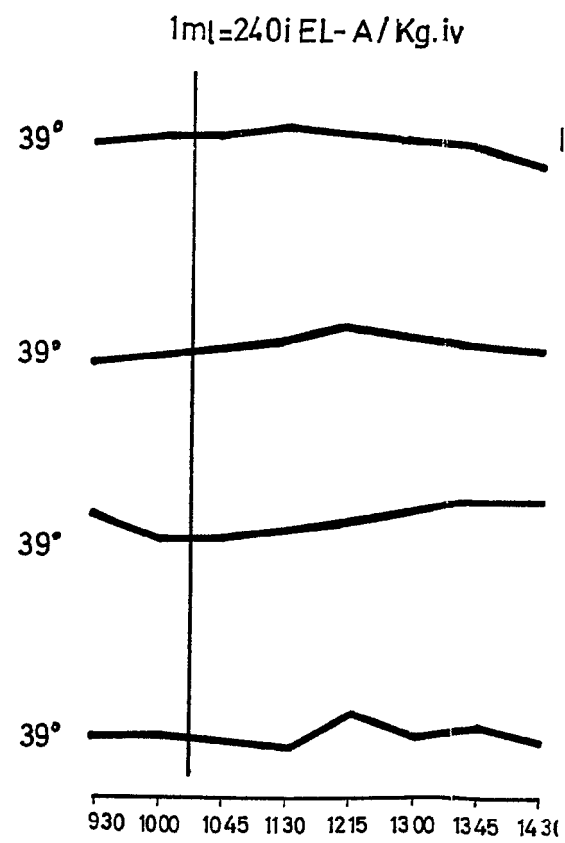
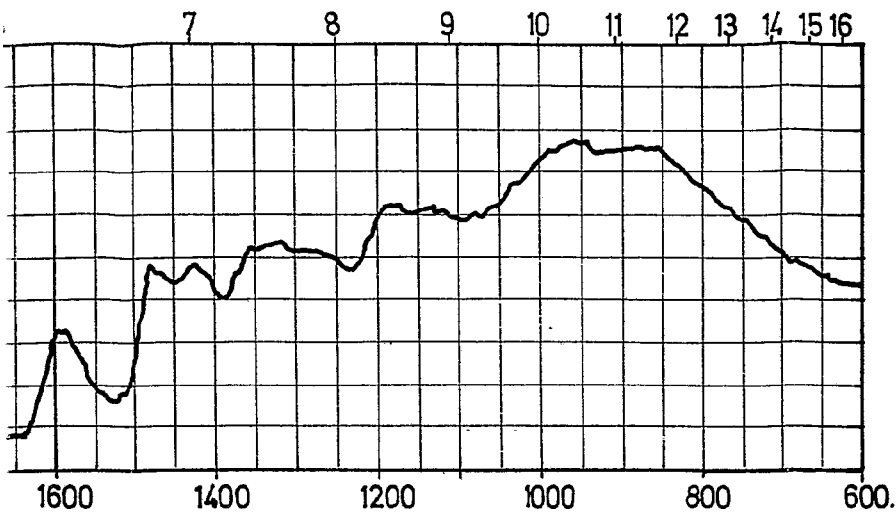
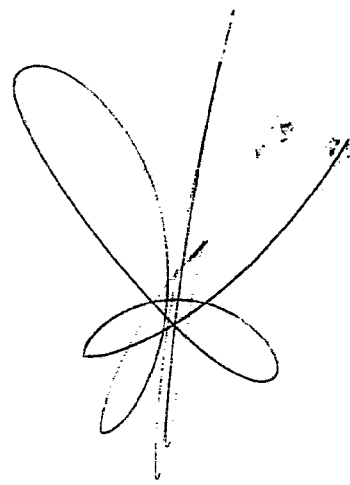
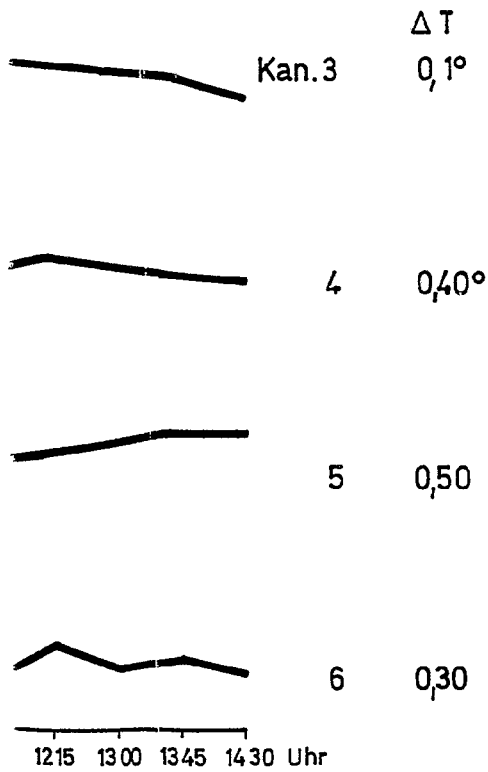


FIG.4





L- A/Kg.iv



DAB.= 051

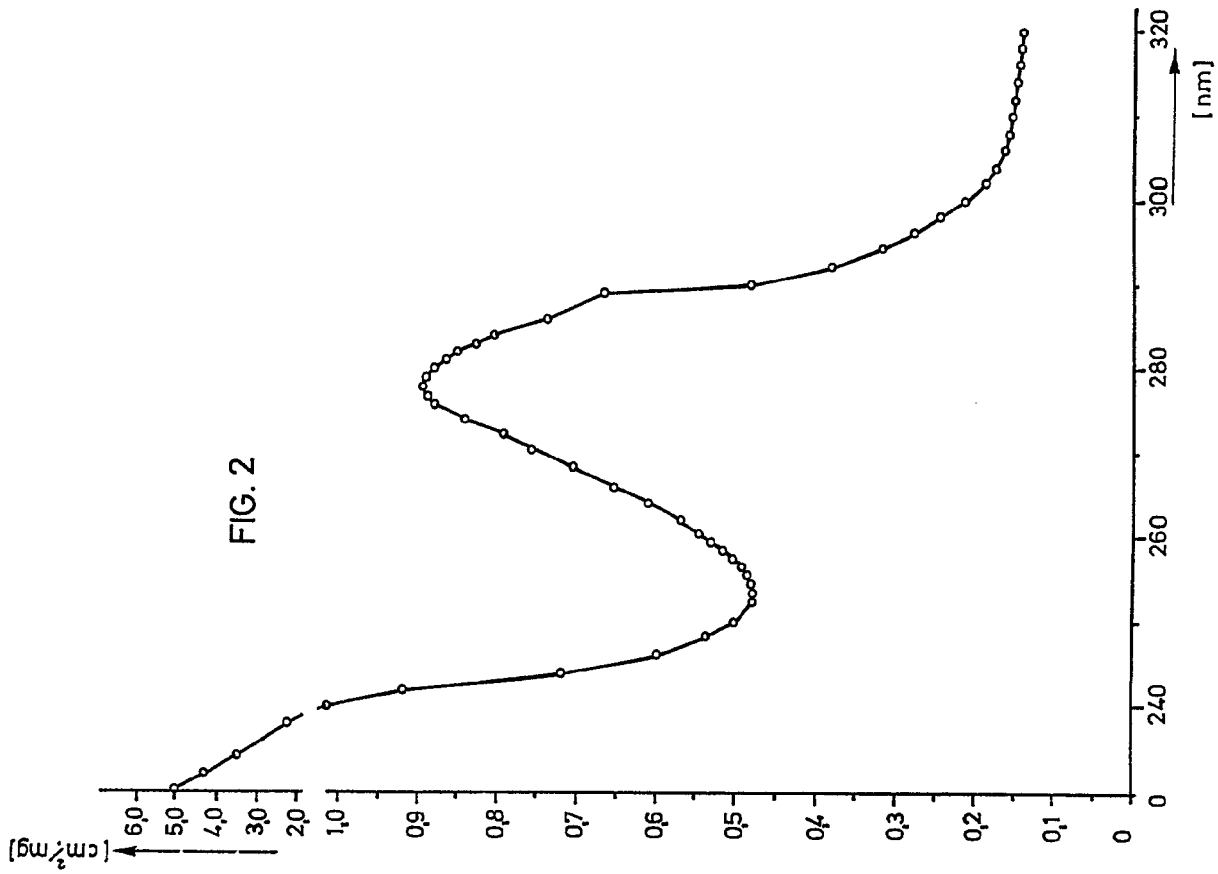
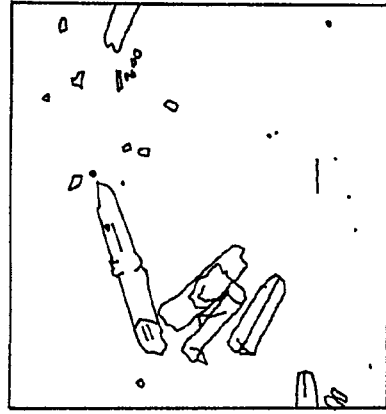
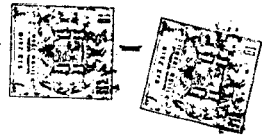
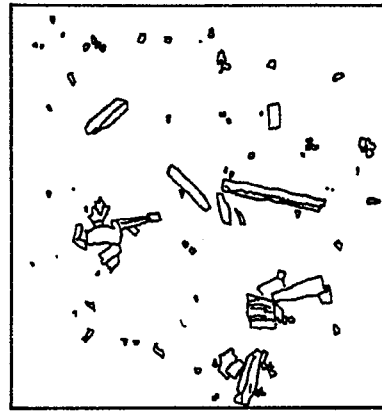


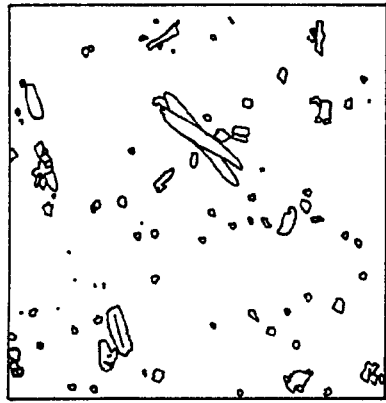
FIG. 3



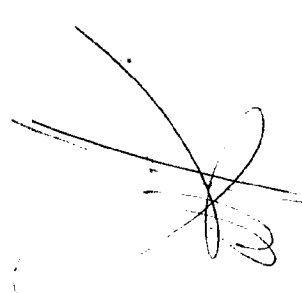
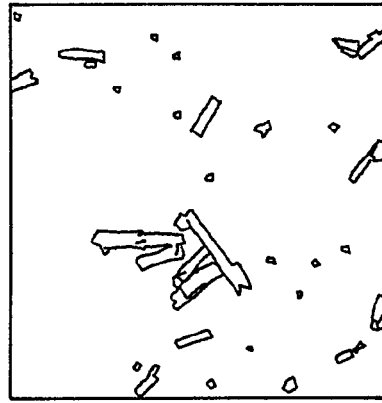
X.700



X.400



X.350



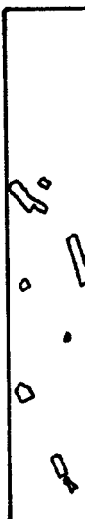
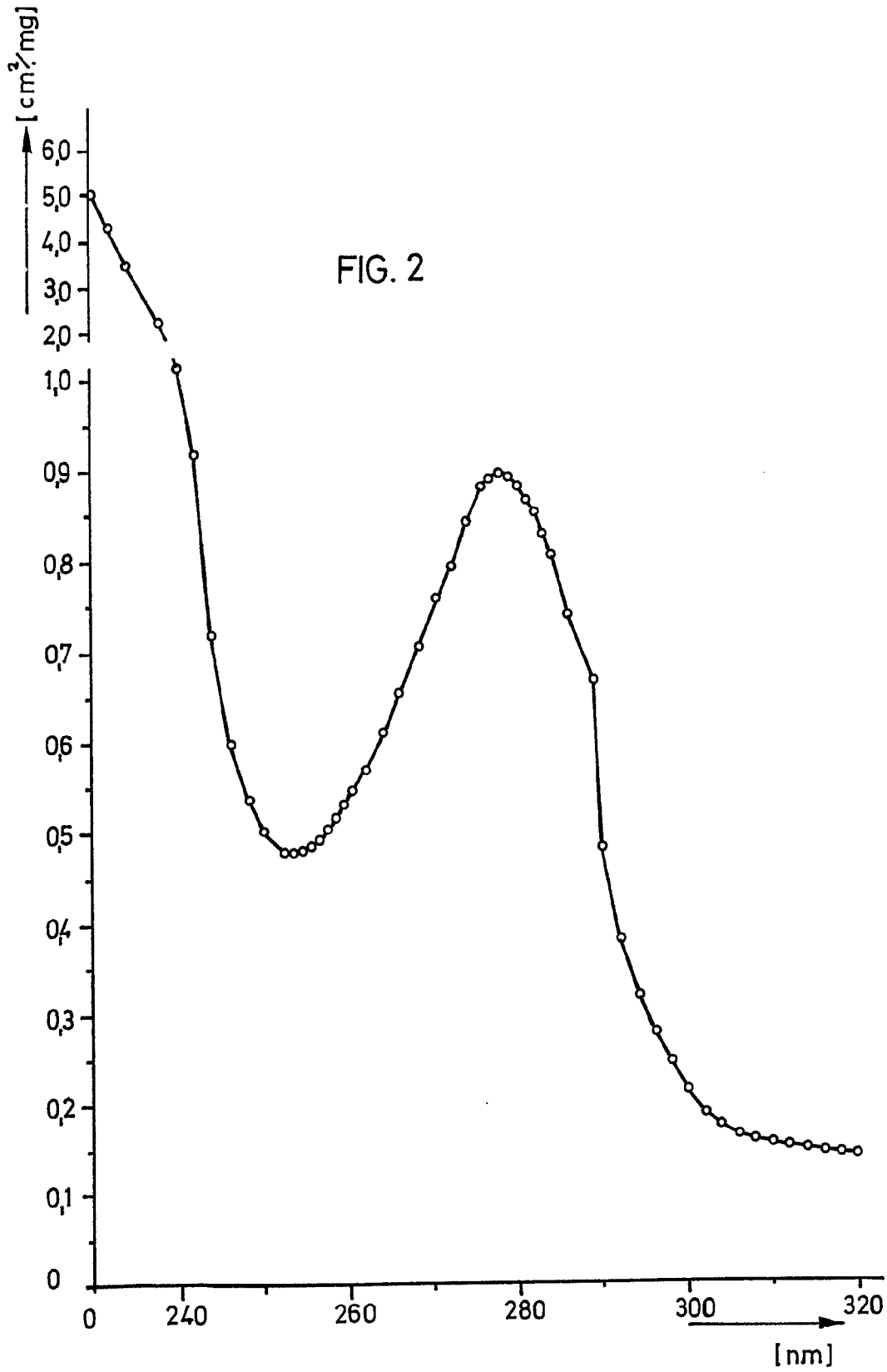
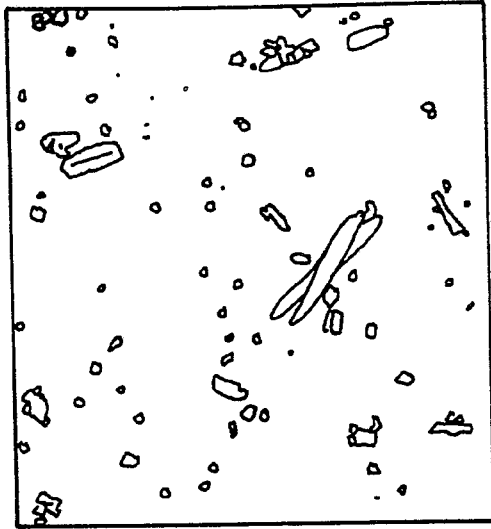
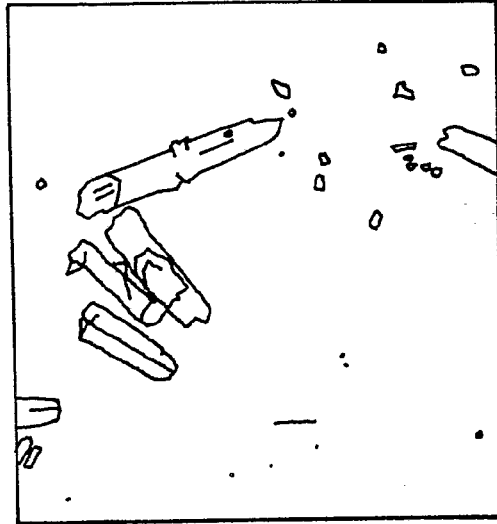


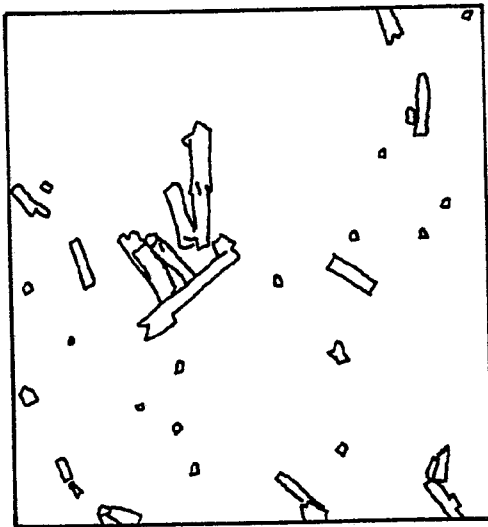
FIG. 3



X.350



X.700



X.400

