

408158



PATENTE DE INVENCION

=====  
Ref: Le A 14 062-Sp.

## Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para la producción de calicreina altamente pura.

=====

*Solicitante* BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente en Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.

=====

Int. Cl.: C07G//A61K
----------------------

La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación y cristalización de calicreina que está constituida por una mezcla consistente en los componentes calicreina A y calicreina B, y a la preparación de los componentes calicreina A y ca

5.

408158

- 2 -



licreina B eventualmente cristalinas, así como a la aplicación de calivreina cristalina, respectivamente de sus componentes, como medicamentos.

5. En la acción sobre cininógeno propio del cuerpo, la calicreina libera las cininas eficaces para la circulación sanguínea. Los preparados de calicreina, por ésto, son utilizados para la terapéutica de diversos trastornos de hiperemia (E.K.Frey, H.Kraut, E.Werle, Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, F.Enke-Verlag, Stuttgart, página 150 f).
10. Para ello, hasta ahora se emplearon preparados parcialmente purificados de la calicreina obtenida de páncreas, glándula submaxilar u orina.
15. Ya se ha dado a conocer que pueden obtenerse preparados de la calicreina a partir del páncreas, de los gánglios submaxilares y de la orina. Para la obtención de calicreina parcialmente purificada, se dieron a conocer diversos procedimientos, por ejemplo según la Patente No. 890.857 de la República Federal Alemana, glándulas conteniendo calicreina pueden ser termolizadas en suspensión acuosa a temperaturas entre 38 y 65°C y las fases acuosas conteniendo calicreina pueden ser separadas de componentes insolubles. Para la obtención de calicreina parcialmente purificada, de acuerdo con la Patente No. 910.580 de la República Federal Alemana, pueden precipitarse orina, así como autolisados de páncreas o gánglios submaxilares con soluciones acuosas de sales de plomo o de cinc, separarse los precipitados, disolverse estos en soluciones amortiguadoras de fosfato, particularmente en soluciones de fosfato de diamonio e hidrógeno, dializarse la solución, concentrarse los dializados y precipitarse la sustancia activa
- 20.
- 25.
30. de los concentrados con disolventes orgánicos, por ejemplo con

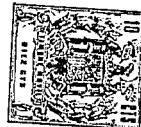


etanol o acetona.

- Los preparados todavía impuros de calicreina pueden ser purificados ulteriormente, por ejemplo según la Patente No. 1.102.973 de la República Federal Alemana, de tal manera, que la calicreina es adsorbida a valores pH de 3 a 10, principalmente al pH de 6,0 a 7,5, sobre celulosas básicamente sustituidas se separan las celulosas básicamente sustituidas y se separan las sustancias acompañantes ineficaces por lavado con una solución amortiguadora fuertemente diluida. La sustancia activa puede ser desorbida de las celulosas básicamente sustituidas con soluciones de electrólito al 1-5 %. Se obtienen preparados con aproximadamente 50 a 100 u.c./mg de proteína [u.c. = unidad de calicreina: determinación de la u.c. por medición de la hipotensión en perros (E. Frey. H. Kraut, E.Werle, Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, F.Enke-Verlag Stuttgart 1968, página 11)]. Los preparados todavía muy impuros de calicreina de acuerdo con la Patente No. 1.124.187 de la República Federal Alemana, para su purificación ulterior, pueden ser sometidos a una electrodiálisis con el empleo de membranas intercambiadoras. Así se obtienen preparados con u.c./mg.
- Los preparados de calicreina así purificados se presentan tan solo condicionalmente para la administración parenteral. El contenido de proteínas extrañas puede conducir, por un lado, a una sensibilización inmunológica y entonces con administraciones repetidas a un choque anafiláctico peligroso para la vida. Por otro lado, con los procedimientos de purificación hasta ahora conocidos, era difícil obtener preparados que eran suficientemente exentos de sustancias pirógenas. Tampoco era posible eliminar los pirógenos por filtración a tra-

408158

- 4 -



vés de capas filtrantes clarificadoras y esterilizadoras, en vista de que la misma calicreina es adsorbida a un grado elevado por estos materiales.

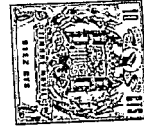
5. Además, se ha dado a conocer que pueden obtenerse menores cantidades de calicreina altamente purificada según diversos procedimientos. Según H.Fritz et al [Hoppe Seiler's Z. Physiol Chem. 348, 1120-1132 (1967)]7, se obtiene un preparado con una actividad específica de 1516 u.c./mg de proteína, de tal manera que, un producto prepurificado según la Patente No. 910.580 de la República Federal Alemana, se cromatografía una a tres veces sobre hidroxilapatito-celulosa, siendo, sin embargo, necesario volver a determinar en ensayos previos cada vez la concentración óptima del amortiguador de elución para cada prueba de calicreina y cada carga nueva de la hidroxilapatito-celulosa.
10. Por ello, ese método no es realizable desde el punto de vista de un procedimiento industrial.
15. De acuerdo con otra proposición [H.Moriya et al, Biochem. Pharmacol. 18, 549-552 (1968)]7, se obtiene calicreina electroforéticamente pura con un rendimiento al 6-9 %, partiéndose de una pasta de páncreas autolisado por sucesiva aplicación de DEAE-celulosa, por precipitación con lactato de 2-etoxi-6,9-diamino-acridinio, por extracción del precipitado con una solución de sulfato de amonio, por precipitación con acetona, por cromatografía sobre hidroxilapatito y por cromatografía sobre Sephadex G 100. También ese procedimiento es técnicamente inutilizable debido al bajo rendimiento y a la pluralidad de etapas.
20. La calicreina obtenida según ese procedimiento a una escala de laboratorio, es una mezcla de dos isoenzimas.
25. Por electroforesis o por cromatografía sobre intercambiadores de
- 30.



- aniones puede disgregarse la calicreina en dos componentes, a saber el componente de calicreina A y el componente de calicreina B [E. Habermann, Hoppe - Seiler's Z. Physiol. Chemie 328, 15-23; F.Fiedler y E.Werle *ibid.* 348, 1097-1089 (1967)].
5. Aún no se sabe si la pequeña diferencia de estructura está en la sucesión del aminoácido o en el componente de hidrato de carbono de la glicoproteína calicreina. No puede distinguirse entre los dos componentes en su eficacia biológica.
10. Calicreina cristalina, así como componentes cristalinos de calicreina A y calicreina B aún no fueron preparados. La presente invención se refiere ahora a un procedimiento sencillo para la obtención de la calicreina pura, eventualmente cristalina, así como a la disgregación de la calicreina para la obtención de los componentes de calicreina A y B puros,
15. eventualmente cristalinos.
20. Se ha encontrado que puede obtenerse la calicreina pura de tal manera que un eluido obtenido según la Patente de la República Federal Alemana No. 910.580, del precipitado formado por la precipitación con una sal de plomo o de cinc se libera de sal, se cromatografía la solución desalada sobre un intercambiador de aniones macroporoso apropiado, por ejemplo DEAE-celulosa o DEAE-Sephadex (marca registrada de la Pharmacia AG. Uppsala, se trata la solución de la calicreina parcialmente purificada así obtenida con un intercambiador de
25. cationes macroporoso apropiado, tal como por ejemplo CM-Sephadex o SE-Sephadex y eventualmente se cristaliza la calicreina. La calicreina cristalina así obtenida supera, en la actividad específica, a todos los preparados hasta ahora conocidos y es exenta de proteínas extrañas que actúan como antígenos, y de pirógenos.
- 30.

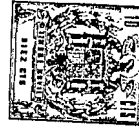
408158

- 6 -



Además, se encontró que componentes puros de calicreína A y calicreína B pueden ser obtenidos de tal manera que un eluido obtenido, según la citada Patente alemana No. 910.580, del precipitado formado por precipitación con una sal de plomo o de cinc, se libera de sal, se cromatografía la solución desalada sobre un intercambiador de aniones macroporoso apropiado, por ejemplo DEAE-celulosa o DEAE-Sephadex, se trata la solución de la calicreína parcialmente purificada con un intercambiador de cationes macroporoso apropiado, por ejemplo CM-Sephadex o SE-Sephadex, se disgrega la calicreína, según procedimientos conocidos, en los componentes A y B y se cristalizan éstos por adición de sulfato de amonio. Los componentes de calicreína así cristalizados superan en la actividad específica a todos los preparados hasta ahora conocidos y con seguridad son exentos de proteínas extrañas que actúan como antígenos, y de pirógenos.

La determinación de la actividad enzimática de la calicreína procede por medición de la hidrólisis de éster etílico de N-benzoil-1-arginina [E. Werle y B. Kaufmann-Bretsch, Naturwissenschaften 46, 559 (1959)] en la forma de realización estandarizada por la F.I.P. (Federation Internationale Pharmaceutique) como ensayo en forma de titulación (Publicación 1972 en J. mond. Pharm.). Para la conversión de las unidades enzimáticas en unidades de calicreína biológicas (u.c.) determinada por medición de la hipotensión en perros (E. Frey, H. Kraut, E. Werle, Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, F. Enke, Stuttgart, 1968, página 11) se usa el factor 1 u.c. = 6,37 unidades de F.I.P. El contenido en proteína de soluciones de la calicreína pura se determina de la extinción a 280 mm, basándose en un coeficiente de extinción de



$E_{280}^{1\%} = 19,3$  (= extinción de una solución al 1 % de calicreína al pH de 7,0).

- Se ha encontrado que la desalación del eluido obtenido según la Patente No. 910.580 de la R.F. Alemana, puede ser
5. efectuada por diálisis o por filtración por un gel. Para la subsiguiente cromatografía sobre intercambiadores macroporosos de aniones, se emplean según la invención particularmente celulosas básicamente sustituidas o geles básicamente sustituidos de suficiente tamaño de poros. De preferencia, se realiza
  10. esta etapa de purificación sobre columnas de DEAE-Sephadex. La adsorción procede a un valor pH de 4,0 a 8,0, preferiblemente de 4,5 a 5,0. La elución procede por aumento de la concentración de sal al valor pH constante o por bajada del valor pH a la concentración constante de sal o por una combinación de ambos procedimientos. El cambio del valor pH y de la concentración salina puede hacerse en forma continuada como elución de
  15. gradiente o en etapas. Pueden emplearse todas las sales amortiguadoras conocidas, son preferidas sales amortiguadoras volátiles, por ejemplo formiato de amonio, acetato de amonio, propionato de amonio o las correspondientes sales de alquilamonio, por ejemplo formiato de trietilamonio. En una realización preferida del procedimiento según la invención, la calicreína es adsorbida de acetato de amonio 0,2-molar, pH = 5,0, sobre DEAE-Sephadex en forma de una columna, la proteína inactiva es eliminada por lavado con acetato de amonio 0,25-molar, pH = 5,0 y
  20. subsiguientemente calicreína enriquecida es eluida con acetato de amonio 0,3-molar, pH = 4,5.
  - 25.

- La cromatografía sobre intercambiadores macroporosos de aniones representa un mejoramiento esencial del procedimiento
30. de la Patente No. 1.102.973 de la R.F. Alemana, el cual es supa

408158

- 8 -



rado decisivamente en rendimiento y en sencillez de la realización a una escala técnica.

5. La calicreina así enriquecida es purificada ulteriormente, de acuerdo con el invento, por tratamiento con intercambiadores macroporosos de cationes. Con ésto se obtienen preparados de una pureza al 90 % aproximadamente. Como intercambiadores macroporosos de cationes pueden emplearse particularmente celulosas ácidamente sustituidas o geles ácidamente sustituidos, por ejemplo poliacrilamidas o dextranas transversalmente reticuladas, con suficiente tamaño de poros. El tratamiento de la solución de la calicreina enriquecida con el intercambiador de cationes puede ser efectuado de tal manera que se extrae por agitación la solución con el intercambiador y que se filtra la solución a través de capas del intercambiador.
10. Si se emplean columnas, es conveniente concentrar la solución de la calicreina enriquecida de la etapa precedente y liberarla de sal. Durante la extracción por agitación, o durante la filtración, los geles retienen sustancias acompañantes, mientras que la calicreina pasa libremente por la capa de gel.
15. Los intercambiadores macroporosos de cationes empleados para la filtración y extracción por agitación, son tratados previamente en forma conocida. Para la filtración, son amasados con soluciones amortiguadoras diluidas y suspendidas por ejemplo en columnas. La proporción de longitud a diámetro de la columna es de importancia secundaria para la filtración. De preferencia, se emplean columnas de gran diámetro. Para la preparación de las soluciones amortiguadoras, se emplean las sales amortiguadoras conocidas, principalmente sales amortiguadoras colátiles, por ejemplo formiato de
- 20.
- 25.
- 30.

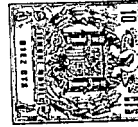


amonio, acetato de amonio, propionato de amonio o las correspondientes sales de alquilamonio, por ejemplo formiato de trietilamonio. El valor pH de las soluciones amortiguadoras puede ser elegido entre 4,5 y 8,5, principalmente entre 5,0 y 7,0.

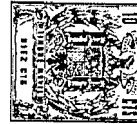
5. Para la obtención de la calicreina cristalina, se cristaliza la calicreina altamente purificada por adición de sulfato de amonio en forma sólida o como solución concentrada a un valor pH de 4,0 a 8,0. A una concentración del sulfato de amonio al 45 % aproximadamente, la cristalización comienza dentro de unos pocos días, preferiblemente a una temperatura de 15 a 25°C. Los cristales tienen la forma de agujas delgadas que se reúnen en haces. Los cristales pueden ser aislados de la lejía madre por centrifugación o filtración, lavados con una solución saturada al 50 % de sulfato de amonio y disueltos en soluciones diluidas de ácido clorhídrico o en agua.
- 10.
15. Los cristales constan de calicreina pura, La actividad específica de aproximadamente 1600 u.c./mg de proteína no puede ser aumentada ulteriormente ni por repetidas recristalizaciones.
20. Para la obtención de los componentes de calicreina eventualmente cristalinos, la calicreina purificada es disgregada en los componentes A y B según procedimientos conocidos por cromatografía sobre DEAE-celulosa o DEAE-Sephadex. También puede realizarse la disgregación en los componentes según este procedimiento ya en una etapa anterior de la vía de purificación y purificarse ulteriormente los componentes disgregados por separado.
- 25.
30. Los componentes altamente purificados de calicreina, según la invención son disgregados en forma sólida por adición de sulfato de amonio o cristalizados como solución concentrada

400158

- 10 -



- a un valor pH de 4,0 a 8,0. A una saturación de sulfato de amonio al 45 % aproximadamente, la cristalización comienza dentro de unos pocos días, preferiblemente a una temperatura de 15 a 25°C. Los cristales tienen la forma de agujas delgadas que se reúnen en haces. Los cristales pueden ser aislados de la lejía madre por centrifugación o filtración, lavados con una solución saturada al 50 % de sulfato de amonio y disueltos en soluciones diluidas de ácido clorhídrico o en agua.
5. Los cristales constan de calicreina A, respectivamente de calicreina B, electroforéticamente uniforme. La figura 1 muestra el resultado de un ensayo de electroforesis. Se trabajó con un amortiguador de barbital sódico (pH = 8,6). La fuerza iónica era de 0,075; la tensión de 100 voltios; la duración de la corrida de 20 minutos. En el tiempo 0, se aplicó a la altura de la línea interrumpida. Se aplicó en 1 la calicreina, en 2 el componente de calicreina A y en 3 el componente de calicreina B. La actividad específica de aproximadamente 1600 u.c./mg de proteína no puede ser aumentada ulteriormente ni por repetidas recristalizaciones.
10. Sorprendentemente, con este procedimiento de acuerdo con la invención se logra separar la calicreina parcialmente purificada de sus sustancias acompañantes y de enzimas extrañas en forma extremadamente sencilla y sin aplicación de engorrosos métodos de elución. No podía preverse que por los intercambiadores macroporosos de aniones son retenidas las sustancias acompañantes y enzimas extrañas, pero no la calicreina y que según el invento se obtiene la calicreina que queda disuelta, con muy buenos rendimientos y de elevada pureza. Por la cristalización de los dos componentes de calicreina A y B son separadas casi totalmente también las sustancias pirógenas difíciles.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



de eliminar. La sencillez del procedimiento según la invención permite su realización también a una escala industrial. Por consiguiente, el procedimiento según la invención representa un enriquecimiento de la técnica.

5. La solución de los cristales de la calicreina, así como de los componentes de calicreina se caracteriza por un espectro UV a un valor pH de 7 con un máximo a 282 mm, un mínimo a 251, dos espaldas a 277 y 290 mm y una proporción de las extinciones a 280 y 260 mm de 1,78 (Véase Figura 2, curva no interrumpida).
10. En NaOH 0,1-normal, el espectro UV muestra dos máximos a 280 y 289 mm (Véase, Figura 2, curva de línea interrumpida).
- La calicreina cristalina obtenida según el invento, así como los componentes cristalinos de calicreina A y B pueden ser utilizados como componentes eficaces de medicamentos.
15. Gracias a su efecto vasodilatatorio, los medicamentos conteniendo calicreina son aplicados, como ya es conocido, particularmente en el caso de trastornos de hiperemia, por ejemplo Endangitis obliterans, Arteriosclerosis obliterans, Morbus Raynaud, en la curación trastornada de heridas y fracturas, por ejemplo el síndrome de Sudeck, quemaduras y trastornos de circulación de la vejez, con buen resultado.
20. La administración puede ser efectuada oralmente en forma de pastillas o gráneas que contienen la calicreina cristalina o sus componentes en mezcla con sustancias de vehículo inertes, atóxicas farmacéuticamente apropiadas, o parenteralmente como inyección intramuscular o también intravenosa de una solución acuosa de la calicreina cristalina o de sus componentes.
25. Particularmente para la administración parenteral, la calicreina cristalina ofrece, en comparación con preparados de menor
- 30.

408158

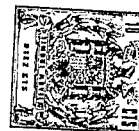


pureza, la ventaja de un peligro ampliamente menor de efectos secundarios indeseados y de reacciones alérgicas.

5. Por adición de coloides de elevado peso molecular según la Patente No. 941.685 de la R.F. Alemana, por ejemplo polivinilpirrolidona o dextrana, o por formación del complejo con el inhibidor de calicreina, conocido bajo la Marca "Trasilol", según la Patente No. 1.000.566 de la calicreina cristalina pueden producirse preparados inyectables de efecto retardado. Calicreina para fines de inyección puede ser preparada
10. tanto como solución isotónica lista para el uso, como también en forma sólida por liofilización de una mezcla de calicreina cristalina o de componentes cristalinos de calicreina con sustancias apropiadas de vehículo, por ejemplo dextrana, manita, lactosa, gelatina, de la cual por disolución en un disolvente
15. apropiado se prepara la solución lista para el uso inmediatamente antes de la administración.

#### Ejemplos

- a) 200 litros de un eluido de un precipitado con una sal de plomo, obtenido de pancreas de cerdo según la Patente No. 910.580 de la R.F. Alemana y dializado, que contienen 10,8
20. mio. unidades de calicreina, fueron concentrados en el evaporador de capa delgada hasta 15 litros y entonces fueron liberados de sal por filtración por un gel sobre una columna de Sephadex G-25. La solución desalada fué ajustada con ácido
25. acético al valor pH de 5,0 y una pequeña cantidad de precipitado formado fué separada por filtración. Entonces se agregó acetato de amoniaco sólido hasta la conductibilidad específica de 12 mS. Esta solución se hizo pasar sobre una columna de 20 x 65 cm (20 1) de DEAE-Sephadex A-50, equilibrado
30. con acetato de amonio 0,2-molar, pH = 5,0, siendo adsorbida



- la calicreina. Subsiguientemente se sometió la columna a la elución primeramente con aproximadamente 40 litros de acetato de amonio 0,25-molar, pH = 5,0 y luego con acetato de amonio 0,3-molar, pH = 4,5. La calicreina aparece en el eluido a poco tiempo después de que el valor pH haya bajado hasta aproximadamente 4,5 (Figura 3). Las fracciones activas contenían 9,35 mio, unidades de calicreina (86,5 %). La solución fué concentrada en vacío y liberada de sal sobre una columna de Sephadex G-25; una muestra liofilizada tenía la actividad específica de 414 u.c./mg de muestra a ensayar.

Explicaciones referentes a la Figura 3

Unidades de ordenada:

- 0 a 800: Unidades de calicreina (KE) por ml de solución,  
 100 a 20: Transmisión UV en % (longitud de onda 280 mm),  
 4,2 a 5,0: Valores pH,

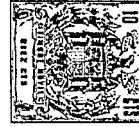
Unidad de abscisa: Número de fracciones.

- La curva no es interrumpida entre las fracciones 5 y 45 representa el desarrollo de la adsorción UV durante el proceso de elución, la curva de línea interrumpida corresponde al desarrollo del valor pH. La línea de conexión de los triángulos corresponde al desarrollo de la actividad durante la elución, indicación en KE (unidades de calicreina)/ml.

- b) La solución desalada con un volumen de 300 ml fué filtrada sobre una columna de 10 a 130 cm (10 litros) de CM-Sephadex C-50, equilibrado con acetato de amonio 0,01-molar, pH = 5,0. En el eluido apareció primeramente calicreina, seguida por impurezas inactivas (Figura 4). La fracción de calicreina (930 ml) contenía 5,5 mio u.c. (59 %). Una muestra liofilizada tenía la actividad específica de 1060 u.c./mg de muestra a ensayar, respectivamente 1220 u.c./mg de proteína. El efec

408158

- 14 -



to pirógeno ascendió según DAB a 1,85 ( $\leq (\Delta T)^2$  de 3 animales).

Figura 4

Unidades de ordenadas:

5. 0-800: KE (unidades de calicreina) por ml de solución,  
100- 20: Transmisión UV en % (longitud de onda 280 mm),

Unidad de abscisa: Número de fracciones.

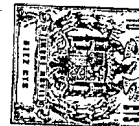
10. La línea de conexión de los triángulos corresponde al desarrollo de actividad del eluido, indicada en KE (unidades de calicreina)/ml. La otra curva representa el desarrollo de la absorción UV.

c) Obtención de calicreina pura:

15. Una parte de la solución conteniendo 115 000 u.c. fué concentrada hasta 5 ml y mezclada con una solución saturada de sulfato de amonio hasta una saturación al 45 %. Al cabo de 6 días a 20-25°C comenzó la cristalización. Al cabo de 3 semanas, se aislaron los cristales por centrifugación, se los lavaron una vez con 5 ml de una solución saturada al 50 % de sulfato de amonio y se los disolvieron en un amortiguador de fosfato 0,05-molar, pH = 7,0. La actividad específica de la calicreina en esta solución era de 1560 u.c./mg de proteína. El rendimiento era de un 71 %, el efecto pirógeno según DAB era de 0,32.

d) Obtención del componente cristalino de calicreina B:

25. 4,42 mio U.c. de una solución de calicreina altamente purificada obtenida según b), fueron adsorbidos sobre una columna de 5 x 100 cm de DEAE-Sephadex A-50, equilibrado con acetato de amonio 0,2-molar, pH = 6,7. La elución fué efectuada con un gradiente convexo de acetato de amonio 0,2 a 0,55-molar, pH = 6,7, preparado con un recipiente mezclador de 2 li-
- 30.



5. tros. En el eluido aparecieron dos ápices de actividad ligeramente solapantes de calicreina, de los cuales el primero fué identificado electroforéticamente como componente de calicreina B, el segundo como componente de calicreina A. Las fracciones conteniendo calicreina pura A, respectivamente B, fueron reunidas. Se obtuvieron 2,1 mio U.c. del componente de calicreina B (47,5 %), 1,25 mio U.c. del componente de calicreina A (28 %) y 0,32 mio u.c. de una mezcla de los componentes de calicreina A y B de la zona de solapamiento de los ápices (7,2 %), en total 83 %.

10. Una parte de la solución conteniendo el componente de calicreina B, fué concentrada hasta una concentración de aproximadamente 20 000 u.c./ml y mezclada con una solución saturada de sulfato de amonio hasta una saturación al 45 %. Al cabo de 6 días a 20-25°C comenzó la cristalización. Al cabo de 4 semanas, se aislaron los cristales por centrifugación, se los lavaron con una solución de sulfato de amonio saturada al 50% y se los disolvieron en un amortiguador de fosfato 0,05 molar, pH = 7,0. La actividad específica era de 1650 u.c./mg de proteína.

20. e) Obtención del componente cristalino de calicreina A:  
De la misma manera que la descrita bajo d), se cristalizó también la calicreina A. En el aspecto microscópico de los cristales de calicreina A y de calicreina B no hay ninguna diferencia.

25. - N O T A -  
Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su

30.

*SA*

403158

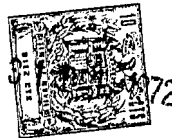
- 16 -



- principio fundamental. También se hace constar que el invento, corresponde a dos Solicitudes de Patente, presentadas en Alemania, con fechas y bajo los números siguientes: 3 de noviembre de 1971, nº P 21 54 556.2, y 3 de noviembre de 1971, bajo el número P 21 54 557.3, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE CALICREINA ALTAMENTE PURA; caracterizándose por lo siguiente:
5. 1ª.- Procedimiento para la producción de calicreina altamente pura, caracterizado porque comprende someter a una elución el precipitado obtenido de órganos, por precipitación con una sal metálica; liberar el eluido de sal; cromatografiarlo sobre intercambiadores de iones macroporosos básicamente sustituidos apropiados; tratarlo entonces con intercambiadores de iones ácidamente sustituidos apropiados; y eventualmente cristalizar la calicreina pura de la solución así obtenida por adición de un agente precipitador apropiado.
10. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque para la producción de un componente cristalino de calicreina A ó B, se somete a una elución un precipitado obtenido de órganos, por precipitación con una sal metálica, se libera el eluido de sal, se lo cromatografía sobre intercambiadores de iones macroporosos básicamente sustituidos apropiados, entonces se lo trata con un intercambiador de iones ácidamente sustituido apropiado, se separa la solución así obtenida de la calicreina altamente pura en los componentes A y B, y se cristalizan estos componentes separados de su solución por adición de un agente precipitador apropiado.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

408158

- 17 -



3ª.- Procedimiento para la producción de calicreina altamente pura, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta Memoria consta de 17 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

5.

31 OCT. 1972

Madrid

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

J. GOMEZ ACEBO Y MUÑEZ  
Asesor Filiales L. Coca Ferrol

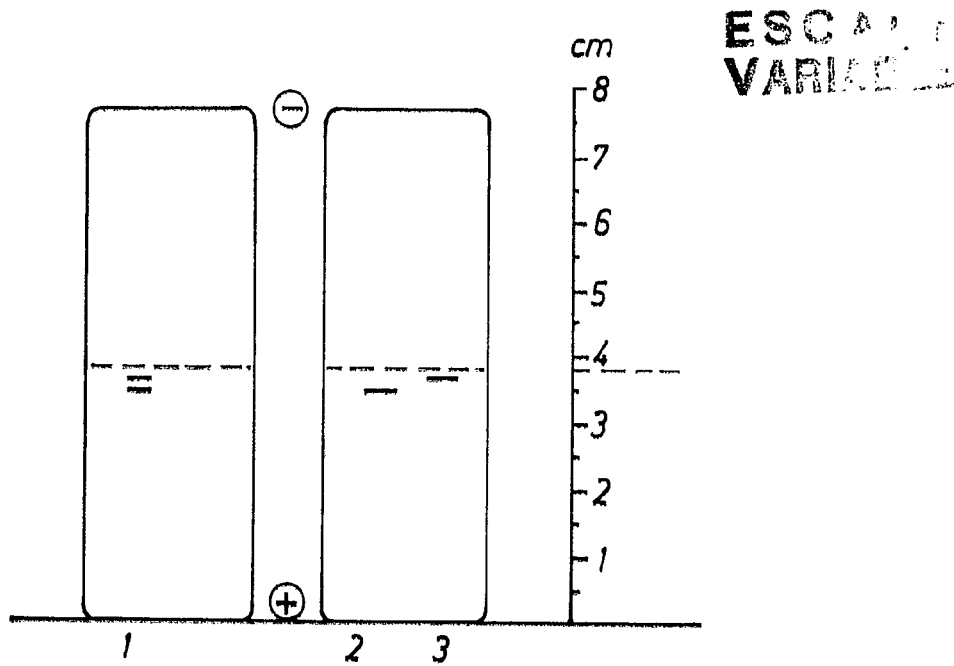


FIG. 1

31 000 000  
M. S. S. S.

J. GOMEZ ACEBO Y MODA  
p. p. Firmador: L. Gasto Fernandez

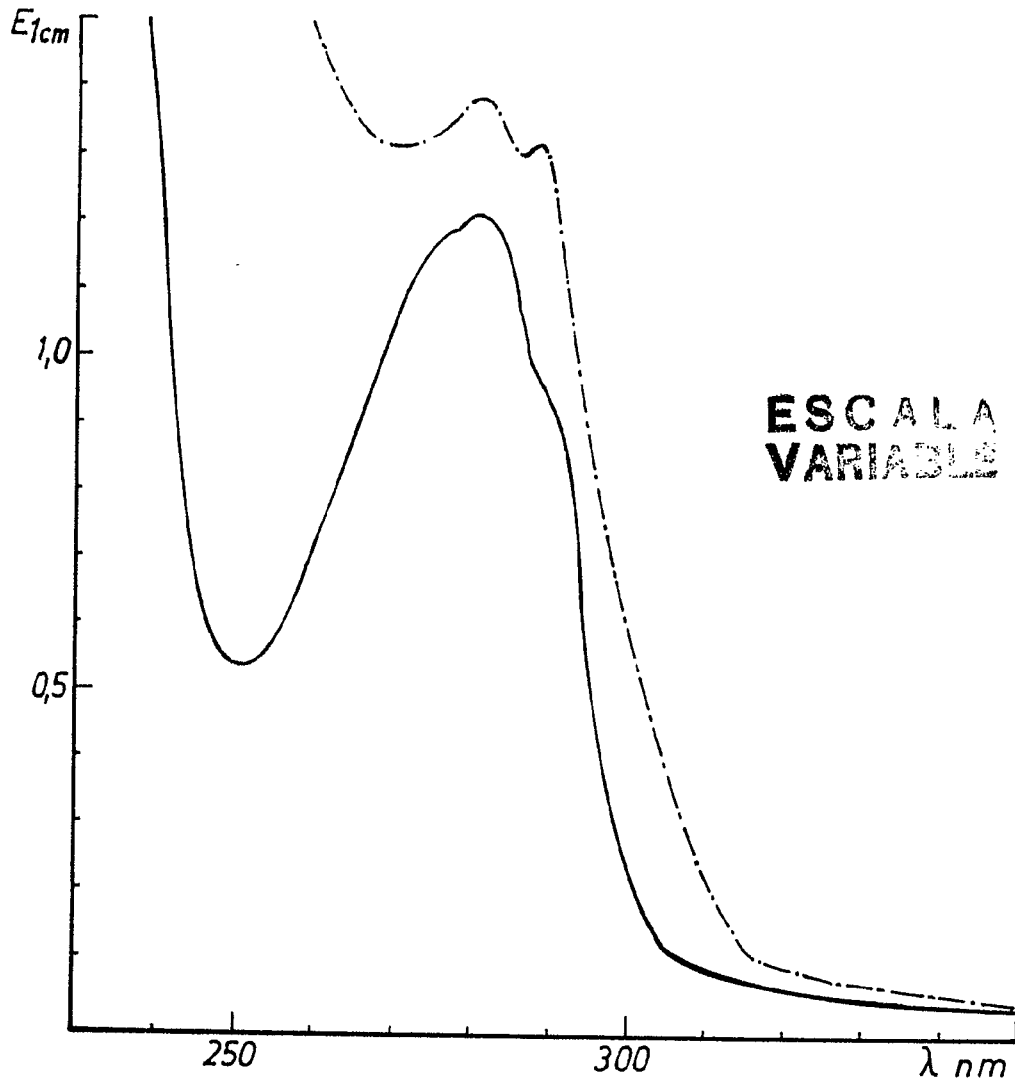
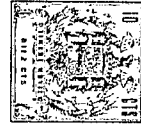
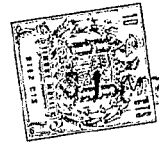


FIG. 2

~~Niada~~

L. GOMEZ ACEBO Y MARTEL  
De p. Firmado: L. Gasto Fernández



31 OCT 1972

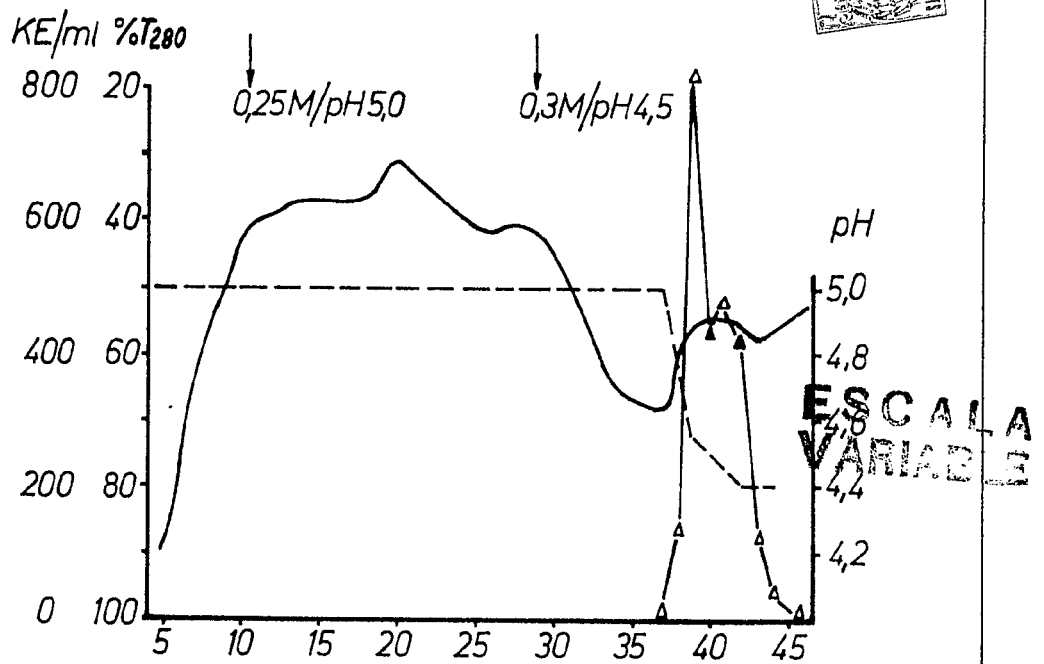


FIG. 3

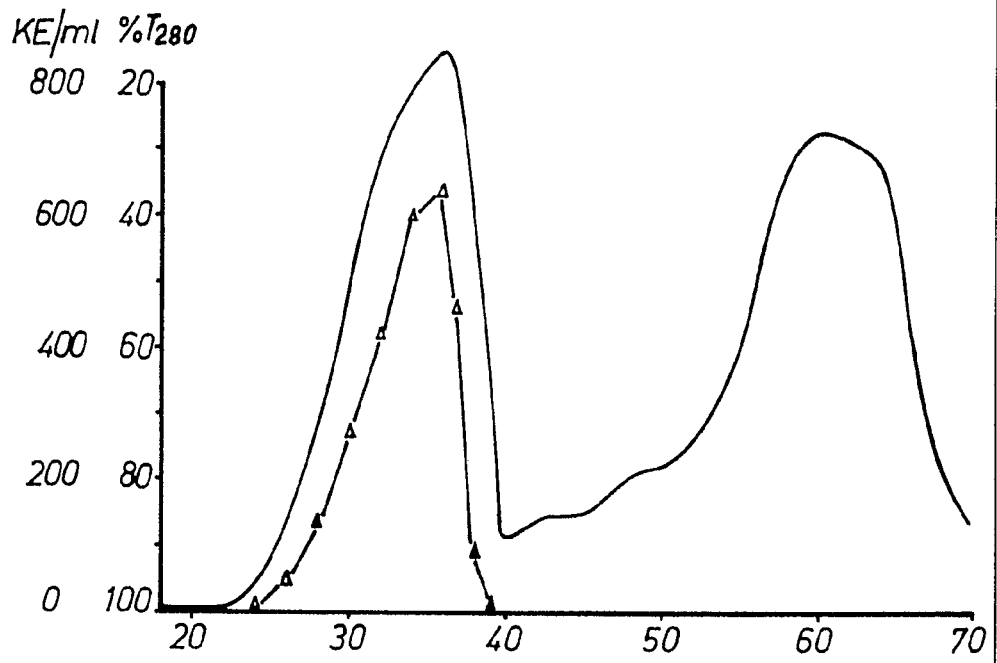


FIG. 4

31 OCT 1972

Madrid

J. GOMEZ ACEBO Y MOJER  
 P. B. Firmado: L. Costa Fernández

*[Handwritten signature]*