

5 MAYO 1975

P.- 60.259

437046

M5/pj

12628-77

**Memoria descriptiva**

Int. Cl.: C07G; A61K

para solicitar 1er. CERTIFICADO DE ADICION por años

a nombre de CHINOM GYOGYSZER-ÉS VEGYÉSZETI TERMÉKEK GYÁRA  
RT.,

entidad ~~de nacionalidad~~ húngara

con domicilio en 1-5 Fő utca, Budapest, IV., Hungría

por Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal Nº 405.274, solicitada el 28 de Julio de 1972, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN CONCENTRADO  
O MEZCLA DE HORMONAS"

(Clase Internacional C07G, A61K)

21.4.75.

La solicitud de patente española principal  
Nº 405.274 se refiere a la preparación de una mezcla  
o concentrado, hasta ahora desconocida, que puede ser  
extraída de la glándula paratiroides y que se denomi-  
na por los solicitantes litoralona. El preparado po-  
see propiedades biológicas muy valiosas. (Véase publi-  
cación alemana DOS Nº 2.234.832).

Como una mejora adicional del invento ante-  
dicho se ha comprobado que el ingrediente activo del  
concentrado denominado litoralona es un micropéptido  
hasta ahora desconocido, a saber la gamma-L-glutamil-  
-taurina.

El presente invento como una mejora del pro-  
cedimiento protegido en la solicitud de patente espa-  
ñola Nº 405.274, es un procedimiento para el aislamien-  
to de este principio activo nuevo y puro a partir de  
un extracto de glándulas paratiroides.

De acuerdo con la solicitud de patente espa-  
ñola Nº 405.274, la glándula paratiroides de mamífe-  
ros, o un cultivo de tejidos o de células del mismo,  
ventajosamente en la forma de un polvo, es sometida  
a extracción con agua, o con una solución acuosa que  
contiene iones inorgánicos, luego el extracto filtra-  
do es tratado con un agente precipitante proteínico,  
el precipitado es filtrado a través de gel y el con-

centrado obtenido de este modo es utilizado.

5 De acuerdo con el presente invento, a partir de este concentrado mediante detección espectroscópica se selecciona el segundo pico o máximo (fracción B) y éste es purificado por cromatografía en columna intercambiadora de iones, después de lo cual el concentrado obtenido es sometido a electroforesis, convenientemente con un valor de pH de 1,8, aplicando un elevado voltaje. Finalmente, la sustancia químicamente pura es aislada por un método cromatográfico.

10

La cromatografía en columna intercambiadora de iones se lleva a cabo ventajosamente utilizando una resina del tipo Dowex 50 (Dow Chem., USA), u otra resina adecuada.

15

En el curso de la electroforesis empleada de acuerdo con el presente invento, la gamma-L-glutamil-aurina emigra en dirección al ánodo.

La separación por cromatografía - que es la etapa final del presente método de aislamiento - se lleva a cabo convenientemente mediante un método de cromatografía en papel o un método de cromatografía en columna de celulosa. La detección del derivado de aminoácido que se requiere aislar se lleva a cabo en esta fase convenientemente con ninhidrina. De este modo

20

25

do el principio activo puro se puede obtener en una concentración de diez a cien mil veces mayor con relación al polvo seco de glándulas paratiroides. En principio, se puede emplear incluso para fines terapéuticos cualquier fracción de la serie de purificación.

El análisis elemental y el peso molecular del producto puro están perfectamente de acuerdo con la fórmula empírica  $C_7H_{14}N_2O_6S$  y con la composición elemental de:

C = 33,07%  
H = 5,55%  
N = 11,02%  
O = 37,75%  
S = 12,61%

Peso molecular = 254,27.

Las siguientes bandas características de la estructura pueden ser asignadas a la estructura de infrarrojos (en gránulos de KBr):

$\nu$ /OH/,  $\nu$ /NH<sub>3</sub><sup>+</sup>/ = 3.600-2.400 cm<sup>-1</sup>  
 $\nu$ /NH/ = 3.315 cm<sup>-1</sup>  
 $\nu$ /CO/ de la oscilación de grupo carboxilo del enlace químico. = 1.758 cm<sup>-1</sup>  
 $\nu$ /CO/ carbonilo amídico /I/ = 1.662 cm<sup>-1</sup>

$$\begin{aligned} \text{S/NH}_3^+ / &= 1.576 \text{ cm}^{-1} \\ \text{S/SO}_3^- / &= 1.296-1.031 \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

Datos de RMN de la gamma-L-glutamyl-aurina:

Los desplazamientos químicos son los siguientes:

5 / /: 4.15 /t/, 1, <sup>2</sup>CH/, 3.12/m, 2, <sup>1'</sup> CH/, 3.65 /m, 2, <sup>2'</sup> CH<sub>2</sub>/, 2.7-2.1 /m, 4, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub> y <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>/.

Protones	Desplazamiento químico	Intensidad relativa
CH-NH <sub>2</sub>	4.15 /t/	1
10 CH <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub>	3.65 /m/	2
CH-NH	3.12 /m/	2
O=C-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	2.7-2.1 /m/	4

15 Datos cristalográficos del compuesto (crista-  
lizado en una mezcla al 80% en volumen de alcohol etílico  
co y agua); Las dimensiones de las células elementales  
(medidas por el método fotográfico de Weissenberg):

$$\begin{aligned} a &= 6,63 \text{ \AA} \\ b &= 7,87 \text{ \AA} \\ c &= 11,38 \text{ \AA} \\ \beta &= 101^\circ \end{aligned}$$

20

Los cristales son monoclinicos, grupo espacial P2<sub>1</sub> :

$$\begin{aligned} D \text{ medido} &: 1,55 \text{ g cm}^{-3} \\ D \text{ calculado} &: 1,552 \text{ g cm}^{-3} \end{aligned}$$

25

Ausencias sistemáticas en OkO :  $k = 2n + 1$ .

El enlace de amida de ácido no puede ser hidrolizado por la carboxipeptidasa, probando esto también la existencia del enlace de gamma-peptido.

5 La velocidad de emigración electroforética está también perfectamente de acuerdo con la calculada teóricamente (con relación al ácido cisteico es de 0,74, pH = 6,5, voltaje = 1.500 V, duración 90 minutos, carga = 0,03  $\mu\text{M}/\text{cm}$ , papel = Whatman 3 MM).

10 Actividad óptica:  $[\alpha]_D^{20} = + 15^{\circ}$  (concentración = 1,021, en agua).

Punto de descomposición 223-226°C (corregido).

15 Después de hidrólisis se puede identificar en el producto hidrolizado ácido glutámico por medio de un analizador de aminoácidos y la taurina se puede identificar por un método de cromatografía en capas.

20 La determinación del contenido de ingrediente activo a escala de mg se puede llevar a cabo por uno de los siguientes métodos: alcalimetría, determinación de los grupos sulfo, método de van Slyke y de terminación rotométrica basada en la reacción con ninhidrina. Para la determinación de menores cantidades,  
25 son apropiados el método de cromatografía con determi

nación densitométrica de la cantidad, así como la de terminación basada en la velocidad de emigración electroforética.

5                    Posteriormente se describirá la determinación biológica.

10                    La estabilidad del producto puro aislado de la glándula paratiroides es farmacéuticamente suficiente. Después de incubación de la sustancia a 70°C durante ocho días en presencia de un termostato no se puede observar ningún signo de descomposición (punto de fusión, actividad óptica, cromatografía en capa delgada, electroforésis en papel).

15                    El ingrediente activo aislado posee amplios efectos terapéuticos y preventivos sobre alteraciones patológicas que están conectadas directa o indirectamente con los daños del "SAGA", es decir el Sistema Aerobioesférico-Genético-Adaptativo (el desarrollo de la glándula paratiroides y el de la vida terrestre coinciden estrechamente en el curso de la evolución).

20                    Para explicar la noción del SAGA, se enumerarán los tejidos y órganos más importantes que constituyen el sistema:

25                    a) Interfases biológicas que forman el límite entre el organismo y la atmósfera como bioesfera (piel y otras estructuras dérmicas, córneas y conjun

tivas, boca y cavidad faríngea, tracto respiratorio y pulmones);

5 b) El sistema de esqueleto y las extremidades (huesos tubulares y esponjosos, juntas de rótula, la membrana sinovial y la musculatura del esqueleto);

10 c) Los órganos que participan en la regulación del equilibrio de iones terrestre (el sistema de transporte transepitelial, y los conductos intestinales, biliares y renales);

d) Los dientes tecodontes requeridos para la desintegración de alimentos sólidos (con el lecho de dientes y fijados por las raíces).

15 e) Organos de audición, olfativos y formadores de sonido terrestres.

20 El compuesto preparado de acuerdo con el presente invento ejerce una influencia biológicamente favorable y respectivamente una favorable influencia terapéutica sobre los órganos del sistema antedicho y respectivamente sobre los tejidos del mismo.

Aparte de lo antedicho - y en relación con el sistema "SAGA" - las siguientes funciones pertenecen también a la esfera de acción del compuesto:

25 Efecto radioprotectivo, efecto favorecedor de la curación de heridas; efecto activador del mesen

quima general, protección contra el daño acrecentado de la membrana mucosa y contra infecciones así como contaminación de la piel (la producción de lisozima de la membrana mucosa húmeda, desarrollo de epitelio ciliado en el tracto respiratorio, etc.); protección acrecentada contra las infecciones fúngicas y virales de la piel.

Contra los efectos significativamente acrecentados de la vida terrestre (por ejemplo alteraciones diurnas meteorológicas y vigorosas, peligro acrecentado de daño) el compuesto actúa en el sentido de estabilizar el síndrome adaptativo, por la evitación simultánea de daños sobre el tejido periférico causado por glucocorticoides (por ejemplo daño de los tejidos conectivos, y respectivamente de la matriz de los huesos, etc.).

El desarrollo de la inmunohomeostasis (el reconocimiento acrecentado de las células propias y de las células no propias).

El compuesto preparado de acuerdo con el presente invento ejerce su actividad de modo parcial directamente mediante guía del metabolismo de vitamina A, por la producción de metabolitos de vitamina A de un carácter más polar. Esta actividad es similar a la ejercida por la parathormona sobre la enzima 25-hidroxi-colecalciferol-1-alfa-hidroxilasa de los conductos renales. Con ayuda de esta explica

ción se podrá comprender la amplia y variable actividad bioquímica, farmacológica y terapéutica de los compuestos.

A/ Efectos de carácter de vitamina A.

5

a/ Efectos farmacológicos y bioquímicos:

El efecto acrecentador de incorporación de sulfato marcado en el cartílago de ratas, respectivamente en la lente ocular del embrión de pollo, en los tejidos hepáticos y pulmonares; el efecto acrecentador de incorporación de fósforo marcado en el cartílago de ratas; el efecto acrecentador de la síntesis de sulfato de condroitidina; curación de heridas o efecto favorable que influye sobre la curación de heridas disminuída causada por administración de cortisona a ratas y perros; efecto acrecentador de la desgranulación de mastocitos; efecto potenciador de vitamina A en el caso de hipovitaminosis o hipervitaminosis experimental en ratas y pollos; el efecto moderador de úlceras de stress en ratas; el efecto acrecentador de la producción de lisozima; el efecto influyente sobre el cambio de elementos traza (silicio, cobre, zinc, manganeso, flúor); el efecto favorecedor de la formación de epitelio; el efecto acrecentador de la actividad de fosfatasa alcalina; el efecto

10

15

20

25

ejercido sobre la formación de bolsas inducido por el efecto local de la vitamina A; el transcurso muy plano de la curva de dosis-respuesta y respectivamente el cambio de signo premonitorio utilizando elevadas dosis.

5  
b/ Efecto terapéutico clínico: queratoconjuntivitis seca; síndrome de Sjögren; rino-laríngeo-faringitis seca; oca; bronquitis crónica; sinobronquitis, mucoviscidosis; inclinación de neumopatías de la niñez; parodontosis; disposición acrecentada de la piel y de la membrana mucosa para infecciones de origen viral y fúngico; el efecto influyente favorable sobre la curación de heridas en casos de heridas operativas y daños de la membrana mucosa; "erosio coli"; grupo de pruritos; perturbaciones de los sentidos del sabor y del olor.

#### B/ Efectos sin carácter de vitamina A

a/ Efectos farmacológicos y bioquímicos; efecto de disminución transitoria de azúcar en la sangre; efecto acrecentador de la fosfaturia, efecto de disminución del nivel de fosfato en el suero; efecto radioprotectivo; en los ensayos en el laberinto de animales inactivos se acorta el tiempo de búsqueda de una meta; el efecto moderador de la fluorosis ex

perimental y de la intoxicación con cadmio; el efecto de disminución de los síntomas de latirismo experimental; el efecto de disminución de la sensibilidad a histamina; el efecto acrecentador de la excreción de monofosfato de adenosina cíclica del riñón; el efecto acrecentador de la actividad de enzima de tirosina-amino-transferasa del hígado.

5  
10 b/. Efectos terapéuticos clínicos; daños por irradiación más suaves; vitiligo; efecto psicoexcitador; los efectos favorablemente influyentes sobre estados gerontológicos involutivos y las funciones inméticas; disposición de queloides; espondilosis anquilopóética; enfermedades de los órganos locomotores de origen de detritus; fundus esclerótico; amiloidosis; morfea; mastopatía fibrocística.

15  
20 La duración del tratamiento con la gamma-L-glutamyl-aurina preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente invento es muy diversa. Por una dosis oral de tres veces 5 µg de la sustancia activa químicamente pura por día algunos de los pacientes quedan libres de síntomas ya después de dos semanas (por ejemplo en el caso de rino-laríngeo-faringitis seca), para la mejoría de algunas  
25 enfermedades se necesitan uno o dos meses (por ejem-

plo síndrome de paradontosis de Stögren), mientras que en el caso de otras enfermedades se requiere un período de tratamiento de tres a seis meses (por ejemplo espondilosis anquilopoética).

5                   A partir de la gamma-L-glutamyl-aurina tra-  
tada de acuerdo con el presente invento se puede pre-  
parar fácilmente cualquier preparado terapéutico, pre-  
ventivo, cosmético o veterinario con un contenido de  
una única sustancia activa o en la forma de combina-  
10                   ciones. A partir de la sustancia activa pura, la do-  
sis es de 50 a 500 nanógramos/peso corporal: dosifi-  
cación : 3 veces por día.

15                   Una tableta contiene 2-20 micrógramos - con-  
venientemente 10 micrógramos del ingrediente activo,  
mezclados con excipientes biológicamente inertes (por  
ejemplo lactosa, almidón) así como los materiales  
auxiliares de formación de tabletas usuales (materia-  
20                   les de granulación y lubricantes, tales como por ejem-  
plo polivinilpirrolidona, gelatina, talco, estearato  
de magnesio, Aerosil, etc.). Tomando en consideración  
la muy pequeña dosis, para obtener una dispersión uni-  
forme de la sustancia activa en la tableta, es conve-  
niente mezclar el principio activo en la forma de una  
solución con la masa para tabletas antes de la granu-  
25                   lación y preparar una mezcla homogénea por medio de

una máquina amasadora. El muy bajo contenido de principio activo hace posible prepararla a una gran escala de laboratorio. El principio activo es estable y por lo tanto las tabletas pueden ser vendidas sin indicación de una fecha más corta de expiración de actividad.

5 El contenido de principio activo de la tableta de liberación retardada y respectivamente de la expánsula, deberá ser de 20 a 30 microgramos.

10 La dosis conveniente del preparado inyectable es de 5 a 10 microgramos de principio activo por ampolla. La administración por vía parenteral puede ser intramuscular, subcutánea o intravenosa. El principio activo no posee ninguna actividad dañina para los tejidos o las paredes de los vasos en la concentración establecida y puede ser aplicado también en la forma de infusión.

15 Los siguientes ejemplos servirán para ilustrar detalles adicionales del invento, sin limitarlo a los ejemplos.

20 Ejemplo 1.

Preparación de gamma-L-glutamyl-aurina a partir de productos naturales.

25

10 g del polvo de glándulas paratiroides li-  
filizado y triturado son desengrasados de acuerdo con  
el método de Aurbach: El polvo de glándulas es mezcla-  
do a fondo con 25 ml de acetona absoluta a la tempera-  
5 tura ambiente y la suspensión es filtrada sobre un fil-  
tro de vidrio (Schott G<sub>4</sub>). Este polvo de glándulas  
filtrado es agitado a fondo de nuevo a la temperatura  
ambiente con cloroformo, y la suspensión es filtrada una  
vez más sobre un filtro de vidrio. Esta operación se re-  
10 pite. La sustancia filtrada es suspendida de nuevo con  
25 ml de acetona absoluta y es filtrada con succión a  
fondo en un filtro de vidrio. El polvo de glándulas ob-  
tenido es secado en vacío a la temperatura ambiente.  
Se obtienen 7 a 9 g del polvo de glándulas seco y de-  
15 sengrasado, dependiendo del contenido de grasas de la  
sustancia de partida.

10 g del polvo de glándulas desengrasado y  
seco son extraídos tres veces con 100 ml de agua des-  
tilada a 30°C. La duración de una operación es de una  
20 hora. Entre cada etapa de extracción, el polvo de glán-  
dulas es separado del líquido acuoso por medio de una  
centrífuga de laboratorio de alta velocidad.

Las porciones sobrenadantes son mantenidas  
en una atmósfera de nitrógeno a una temperatura de  
25 3 a 5°C en un refrigerante hasta su tratamiento ulte-

rior. El extracto acuoso es positivo frente a nin hidrina, frente a biuret y frente a ácido triclora acético.

5 En la siguiente operación, los extractos acuosos son reunidos por vertido y se añade gota a gota una solución acuosa de ácido tricloraacético al 50% en volumen, al extracto acuoso, agitándolo continuamente de manera que la concentración final de ácido tricloraacético sea de 15%.

10 La solución acuosa precipitada es dejada reposar a 3 hasta 5°C durante 2 horas, después de lo cual el precipitado, formado añadiendo el ácido tricloraacético, es eliminado por centrifugación. La solución filtrada no proporciona ninguna precipitación adicional cuando se añade ácido tricloraacético.

15 El exceso de ácido tricloraacético es eliminado por extracciones en serie con éter acuoso a la temperatura ambiente. Para la total eliminación del ácido tricloraacético se requieren generalmente 17 ó 18 extracciones. Algunas veces son necesarias 20 a 25 extracciones. Después de la última extracción, el valor del pH deberá estar entre 4,5 y 5.

25 El contenido de éter de la fase acuosa es eliminado por evaporación a presión reducida (atmósfera de nitrógeno, aproximadamente 15 a 20 mm de Hg,

por debajo de 30°C), por medio de una bomba con fil  
tro de vidrio. La operación requiere aproximadamente  
6 horas. La eliminación del éter es seguida por una  
disminución del volumen, ya que también se evapora  
5 una parte del agua durante el proceso.

La eliminación del éter es comprobada me-  
diante el olfato.

La solución acuosa es liofilizada y mante-  
nida en un recipiente bien cerrado ya que la sustan-  
10 cia es higroscópica. El rendimiento, comparado con  
el peso del polvo de glándulas antes del desengrasa-  
do, es de aproximadamente 10 a 15% dependiendo del  
contenido de grasas del material de partida.

La sustancia liofilizada obtenida es some-  
15 tida a filtración a través de gel sobre Sephadex-  
G-15 (Pharmacia, Uppsala, Suecia; tamaños de parti-  
culas 90 a 120  $\mu$ ) por tecnología descendente.

El diagrama de elución es determinado por  
la extinción medida a 280 nm. Por este método se ob-  
20 tienen en total 7 picos (de A hasta G).

Los parámetros característicos de la filtra-  
ción a través de gel son los siguientes:

Dosificación ponderal : 5,1 g de la sustancia liofil-  
zada disueltos en 10 ml de  
agua destilada.

25 Diámetro de la columna: 4,85 cm

Altura de la columna : 149 cm  
 Caudal : 0,78 ml/minuto  
 Tamaño de fracciones : 7,8 ml/tubo

	<u>Pico</u>	<u>Tubo</u>
5	A	77 - 103
	B	104 - 128
	C	129 - 134
	D	135 - 162
10	E	163 - 189
	F	190 - 217
	G	218 - 227

El pico B contiene el ingrediente activo.

15 El volumen de elución hasta el tubo 104 es de 814 ml, y el volumen total del pico B es de 188 ml.

La fracción B es liofilizada. De este modo se obtienen 0,43 a 0,53 g utilizando alrededor de 5 g del material de partida.

20 Identificación de la filtración a través de gel:

25 Cuando la filtración a través de gel se lleva a cabo en las circunstancias mencionadas, la sustancia activa aparece en el eluato con el volumen de  $(0,67 \pm 0,02/ \times V_0$ .  $V_0$  significa el volumen con el

que aparecen los iones inorgánicos en el eluato (reac-  
ción positiva de cloruro cuando se detecta por nitra-  
to de plata).

5 El pico B liofilizado es sometido luego a  
cromatografía por intercambio de iones. 301 mg del pi-  
co B liofilizado son disueltos en una cantidad tal de  
una mezcla de ácido fórmico y ácido acético de pH 1,8<sup>\*\*</sup>  
que la solución ha de tener una concentración de 30%.  
Después de ello la solución es sometida a cromatogra-  
10 fía sobre una columna de un tamaño de 132 x 1 cm rellena  
con resina Dowex 50 x 2 (Dow Chemical, USA), después  
de haber equilibrado la columna con una mezcla de áci-  
do fórmico + ácido acético a un valor de pH de 1,8. La  
velocidad de circulación es de 13 ml/hora. El tamaño  
15 de las fracciones es de 4 ml. Las fracciones son de-  
tectadas sobre la base del valor de extinción a 280  
nm. De esta manera se obtienen 9 picos de elución (de  
A hasta I).

20

25

<sup>\*\*</sup>(Preparación del tampón: 36 ml de ácido acético gla-  
cial y 25 ml de ácido fórmico [33% en volumen] se di-  
luyen a 1000 ml con agua destilada).

	<u>Signo:</u>	<u>Tubos:</u>	<u>Peso (mg)</u>
	A	9 - 12	8,4
	B	13 - 17	18,4
	C	18 - 23	64,4
5	D	24 - 29	5,2
	E	30 - 36	2,2
	F	37 - 42	0,5
	G	43 - 50	3,1
	H	51 - 57	7,3
10	I	58 - 80	<u>6,8</u>
			116,3 /38,6%/

El ingrediente activo puede ser encontrado en los picos D, E y F. Los eluatos unificados de los tres picos son liofilizados y se obtienen 7,9 g de una sustancia, 2,62% del pico B filtrado a través de gel que servía como material de partida.

Los picos liofilizados obtenidos por cromatografía por intercambio de iones son sometidos a electroforésis en papel sobre un papel Whatman MM, de 22 cm de anchura, a pH 1,8 y 1.500 V durante 90 minutos.

El ingrediente activo es positivo frente a ninhidrina y emigra uniformemente desde la línea de partida hacia el polo positivo.

Después de la electroforé-  
5 tiva frente a ninhidrina, con la velocidad de emigra-  
ción apropiada, debe ser cortada y cosida sobre la  
nueva hoja de papel de cromatografía de una manera  
tal que la dirección del revelado por cromatografía  
sea opuesta a la de la emigración electroforética. La  
purificación ulterior por cromatografía en papel des-  
cendente se lleva a cabo a la temperatura ambiente en  
una mezcla de alcohol n-butílico: piridina: ácido acé-  
10 tico glacial : agua (15:10:3:12) en 60 horas. Se uti-  
liza papel Whatman 3 MM.

El valor  $R_f$  del compuesto puro en el siste-  
ma de revelado establecido es de 0,19. Su movilidad  
relativa con respecto a la del ácido cisteico cuando  
15 se somete a electroforé-  
sis en papel a un valor de pH  
de 6,5 es de 0,74. Después de hidrólisis con ácido  
clorhídrico el producto contiene ácido glutámico y  
taurina. El producto aislado no puede ser hidroliza-  
do por carboxipeptidasa. Peso molecular = 254,27.

20 Análisis :  $C_7H_{14}N_2O_6S$ .

La presente solicitud, que corresponde a la  
presentada en Hungría, el 29 de Abril de 1974, bajo el  
Nº PE- 928, se acoge a los beneficios del Artículo 51  
25 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

## REIVINDICACIONES

5            Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Certificado de Adición en España, son los siguientes:

10            1ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal Nº 405.274, solicitada el 28 de Julio de 1972, por: "Un procedimiento para la preparación de un concentrado o mezcla de hormonas", caracterizadas por que para el aislamiento de gamma-L-glutamyl-taurina a partir del extracto de glándulas paratiroides, después de la extracción de las glándulas paratiroides o el cultivo de tejidos o células de las mismas, ventajosamente en la forma de un polvo, con agua o con una solución acuosa que contiene iones inorgánicos, y de que el extracto filtrado hubo sido liberado de proteínas y liofilizado, el producto es disuelto en agua y la solución es sometida a filtración a través de gel, la fracción que contiene el principio activo, seleccionada ventajosamente por detección por espectroscopia, es liofilizada, después de lo cual el producto liofilizado es disuelto en agua y la solución obtenida es purificada por cromatografía en columna de intercambio de iones, el concentrado

15

20

25

del principio activo es sometido a electroforesis, y finalmente la gamma-L-glutamyl-aurina es aislada por un método de cromatografía.

5 2ª.- Mejoras de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizadas porque en la filtración a través de gel se selecciona la fracción que aparece por elución con un volumen de  $V_0$  ( $0,67 \pm 0,02$ ) en donde  $V_0$  significa el volumen con el que aparecen en el eluato los iones inorgánicos.

10 3ª.- Mejoras de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizadas porque durante la filtración a través de gel se selecciona el eluato de segundo pico, que había sido detectado por extinción a 280 nm, como material de partida para purificación ulterior.

15 4ª.- Mejoras de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizadas porque la electroforesis se lleva a cabo con un valor de pH de aproximadamente 1,8 y aplicando un alto voltaje.

20 5ª.- Mejoras de acuerdo con las reivindicaciones 1ª - 2ª, caracterizadas porque la separación por cromatografía se lleva a cabo por cromatografía en papel o por cromatografía en columna de celulosa.

25 6ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal Nº 405.274, solicitada el 28 de Julio de 1972, por: "un procedimiento para la preparación de

un concentrado o mezcla de hormonas".

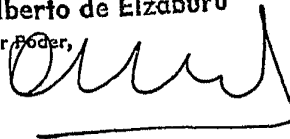
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

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

Madrid, 15.DIC.1976

P.A.

Alberto de Elizaburu  
Por Poder,



10  
15

20

25

14.12.76  
EBL. -