



ESPAÑA

19	ES	11	NUMERO	10	A2
		21			
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			- 5 MAYO 1976		

CERTIFICADO DE ADICION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31	NUMERO			
		75 13932	5 Mayo 1975		Francia

11 MAR. 1977

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	52	PATENTE A LA CUAL SE ADICIONA
			A.61K		432.404

64 TITULO DE LA INVENCIÓN

"Perfeccionamientos en el objeto de la patente de invención nº 432.404 por Procedimiento de obtención de un activador del plasminógeno"

71 SOLICITANTE (S)

PIERRE FABRE S.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

125, rue de la Faisanderie, 75016 Paris, Francia

72 INVENTOR (ES)

Lucien Dussourd D'Hinterland, Lucien Pradayrol, Jacques Durand y Gérard Normier

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

M. Curell Sufiol

329 155
EX-FR

PRIMER CERTIFICADO DE ADICION

solicitado en España a favor de PIERRE FABRE S.A., de nacionalidad francesa, domiciliada en 125, rue de la Faisanderie 75016 París, Francia, por "Perfeccionamientos en el objeto de la patente de invención nº 432.404 por Procedimiento de obtención de un activador del plasminógeno", con prioridad de la solicitud francesa 75 13932 de fecha 5 Mayo 1975. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

5. La presente invención, realizada en el Centro de Investigación Pierre Fabre, es una adición a la patente solicitada el 3 diciembre 1973 con el número 73 42981 (que corresponde a la patente española nº 432.404 por "Procedimiento de obtención de un activador del plasminógeno"). Esta adición se refiere esencialmente a un perfeccionamiento en el objeto reivindicado en la solicitud principal. - - - - -

10. La solicitud principal se refiere a un nuevo activador del plasminógeno extraído de órganos animales y a un procedimiento para la preparación de dicho activador. - - - - -

El solicitante ha descubierto que la acción del activador del plasminógeno descrito en la patente principal po-

día ser muy fuertemente potenciada asociando este compuesto con un polisacárido sulfatado. - - - - -

5. Es por ello por lo que la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un nuevo compuesto que contiene, a título de componentes activos, por lo menos un activador del plasminógeno según la solicitud principal y un polisacárido sulfatado. - - - - -

10. En el modo de realización preferido de la presente invención, el polisacárido sulfatado utilizado es un sulfato de dextrano que presenta preferentemente un peso molecular comprendido entre aproximadamente 3.000 y 15.000 y que contiene entre aproximadamente 10 y 20% de azufre. - - - - -

15. Este polisacárido puede ser utilizado, o bien en asociación simple con el activador del plasminógeno por simple mezcla de los dos productos, o bien en forma de complejante para el activador. Los ensayos realizados han mostrado que las actividades de la asociación simple y del complejo eran próximas. - - - - -

20. El polisacárido sulfatado es utilizado en cantidad comprendida entre 10 y 30% en peso del activador dosificado en proteína y preferentemente en cantidad del orden del 20% en peso del activador dosificado en proteína. - - - - -

25. El polisacárido sulfatado utilizado puede prepararse por cualquier procedimiento conocido, como por ejemplo por esterificación del polisacárido por un ácido azufrado mineral

u orgánico en presencia de una base que fije el agua. Así, el sulfato de dextrano, puede prepararse por degradación del dextrano en caliente en medio ácido sulfúrico para reducir el peso molecular del dextrano, y después esterificación del dextrano obtenido por el ácido clorosulfónico en piridina. - - -

5.

Cuando el producto se prepara en forma de un complejo, la formación del complejo se efectúa a un pH próximo a la neutralidad adicionando la cantidad necesaria de polisacárido sulfatado al activador en solución, después el pH de la solución es progresivamente acidulado hasta un valor próximo a 6, lo que conduce a la precipitación del complejo deseado. Después de recuperación del precipitado, éste puede ser redisolto en un tampón a un pH próximo a 7 y liofilizado.

10.

Cuando tiene lugar la formación del complejo, se utiliza preferentemente el ácido fosfórico para bajar el pH de la solución y se conduce la precipitación en la proximidad de +4°C. - - - - -

15.

La presente invención se refiere también a un procedimiento perfeccionado para la preparación del activador del plasminógeno. - - - - -

20.

Este procedimiento, como el descrito en la patente principal, consiste en tratar un polvo acetónico de órganos animales elegidos entre los pulmones y los riñones de cerdos, terneras, bueyes, caballos, corderos u ovejas o los ovarios de porcinos, bovino u ovino, por: - - - - -

25.

a) puesta en suspensión del polvo acetónico en un tampón acetato que tenga una fuerza iónica comprendida entre 0,01 y 0,1 a un pH próximo a la neutralidad; - - - - -

5. b) nueva toma del precipitado obtenido en la etapa a) en un tampón acetato que tenga una fuerza iónica comprendida entre 0,6 y 1 a un pH comprendido entre 3 y 5; - - -

c) precipitación de la solución obtenida después de decantación en la etapa b) por adición de una sal a un pH comprendido entre aproximadamente 3 y 5; - - - - -

10. d) nueva toma del precipitado obtenido en la etapa c) en un tampón acetato y precipitación por adición de una sal a un pH comprendido entre 7 y 8; - - - - -

15. e) precipitación de la solución obtenida después de clarificación en la etapa d) por adición de una sal en la proximidad de la neutralidad; - - - - -

f) purificación del precipitado obtenido. - - - -

20. La etapa f) de purificación se conduce preferentemente por precipitación del activador en pH isoelectrico, es decir a un pH comprendido entre 6,3 y 6,5 y con una resistividad de la solución del orden de 450 ohmios.cm y cromatografía del precipitado obtenido después de la nueva puesta en solución. La cromatografía utilizada es preferentemente una cromatografía de afinidad. - - - - -

Como en el procedimiento de la solicitud principal, la sal utilizada para las precipitaciones en las etapas c), d) y e) es preferentemente el sulfato de amonio cristalizado. En la etapa c) cuando se utiliza el sulfato de amonio, éste es empleado a una concentración comprendida entre aproximadamente 200 y 300 g/l y en las etapas d) y e) a una concentración comprendida entre aproximadamente 60 y 80 g/l. - - - -

5.

Un esquema general de preparación de un activador del plasminógeno complejo según la presente invención se dará a continuación a fin de ilustrar el modo de realización preferido de la invención y a fin de poner mejor en evidencia ciertas características de la presente invención sin, en cambio, limitarla. - - - - -

10.

El polvo acetónico que constituye la materia prima de base destinada a la preparación del activador del plasminógeno se prepara preferentemente como sigue. - - - - -

15.

Después de ser descongelados y triturados, los órganos tratados son dispersados en un baño de acetona a una temperatura inferior a -10°C y sometidos a una agitación vigorosa. La suspensión así obtenida es filtrada y la torta de filtración es aclarada con acetona antes de ser secada bajo nitrógeno. - - - - -

20.

a) Lavado preliminar:

El polvo acetónico es puesto en suspensión en un tampón de acetato que tiene una fuerza iónica del orden de

25.

0,02, siendo el pH de la solución próximo a la neutralidad. Se agita esta solución durante una hora a +4°C, después se es curre el residuo de polvo acetónico y se elimina la solución sobrenadante. - - - - -

5. b) Extracción:

El residuo es puesto en suspensión en un tampón acetato, estando el pH comprendido entre 3 y 5, esta suspensión es agitada durante 3 horas a +4°C. Después de escurrido, se elimina el residuo de polvo no extraído y se pasa la solución recuperada al clarificador. - - - - -

10.

c) Primera precipitación en medio ácido:

El extracto clarificado obtenido en la etapa b) es precipitado en medio ácido a un pH próximo a 4,5 por adición de sulfato de amonio a una concentración comprendida entre 290 y 300 g/l, el precipitado así obtenido es puesto de nuevo en solución en un tampón acetato, después el pH de esta solución es elevado de nuevo a un valor comprendido entre 7 y 8 con sosa concentrada. - - - - -

15.

d) Segunda precipitación en medio débilmente básico:

La solución precedente es de nuevo precipitada por adición de sulfato de amonio a una concentración comprendida entre aproximadamente 60 y 80 g/l. Después de paso por el clarificador, el precipitado inactivo es eliminado y la solución

20.

es ajustada a un pH próximo a 7. - - - - -

e) Tercera precipitación en la proximidad de la neutralidad:

5. La solución así obtenida es precipitada una tercera vez por adición de sulfato de amonio a una concentración comprendida entre 60 y 80 g/l. El precipitado formado es pasado por el clarificador y lavado con agua destilada neutra.

10. El precipitado así obtenido es dispersado en agua destilada y la solución es acidulada hasta pH 4. Después de centrifugación se recoge el sobrenadante y se diluye varias veces con agua destilada hasta una resistividad de 600 a 650 ohmios.cm. - - - - -

El pH de la solución es entonces llevado entre 6,3 y 6,5 con una resistividad del orden de 450 ohmios.cm. - - -

15. El precipitado formado es recuperado por centrifugación, después dispersado en un tampón fosfato. El pH de la solución, que es entonces próximo a la neutralidad, es elevado de nuevo con la ayuda de una base hacia unos valores comprendidos entre 9 y 10, y después devuelto a la proximidad de la neutralidad. - - - - -

20. La solución centrifugada es entonces recogida. Es sobre esta solución que se efectúa la cromatografía de afinidad. - - - - -

El soporte de cromatografía utilizado es del tipo AH-Sépharosa 4B sobre el cual se ha acoplado previamente un inhibidor específico del activador del plasminógeno por una carbodiimida. - - - - -

5. Los inhibidores utilizables son el ácido ϵ -amino caproico, el ácido amonietilciclohexanoico, el ácido trans-4-aminoetilciclohexanocarboxílico y el ácido paraaminometilbenzoico. - - - - -

10. La cromatografía de afinidad puede realizarse también sobre un soporte Sépharosa activado con CNBr sobre el cual se puede fijar la lisina o uno de los productos citados precedentemente. Es posible, desde luego, utilizar otros soportes sobre los cuales el acoplamiento es realizable, por ejemplo la serie de los Biogels. - - - - -

15. Se eluye la fracción que queda fijada sobre el soporte por medio de un gradiente de fuerza iónica. Se procede entonces, sobre el eluido, a la dosificación de las proteínas y de la actividad según los métodos descritos más adelante. -

20. A la solución así obtenida se adiciona, a un pH próximo a la neutralidad, un polisacárido sulfatado en cantidad igual al 20% de la cantidad de proteínas presentes en la solución; el pH de la solución es progresivamente acidulado a unos valores próximos a 6. El activador precipita entonces en forma de un complejo con el polisacárido sulfatado. El precipitado es recogido por centrifugación, después se disuelve en un tampón a un pH próximo a 7 antes de ser liofilizado. - - - -
- 25.

Ejemplo:

10 kg de ovarios de cerda conservados a -20°C son descongelados a -5°C y después triturados con la ayuda de un triturador de carnes con una reja de 5 mm. El triturado es a continuación dispersado en 75 l de acetona a -20°C . Después de una agitación vigorosa durante 1 hora la suspensión es filtrada en un Buchner y la torta es aclarada sobre el filtro con acetona a -20°C . Se desmoldea entonces la torta y se seca en una columna bajo una corriente ascendente de nitrógeno seco. Se obtienen 1,3 kg de polvo acetónico que puede ser conservado a $+4^{\circ}\text{C}$. - - - - -

15. a) El polvo acetónico así obtenido es puesto en suspensión en 30 l de tampón acetato M/100, pH 6,5. Se agita vigorosamente durante 1 hora a $+4^{\circ}\text{C}$, después se escurre. Se recogen entonces los órganos y se elimina el filtrado. Los órganos son a continuación puestos otra vez en suspensión en 10 l del mismo tampón acetato, después agitados durante 15 minutos a $+4^{\circ}\text{C}$ antes de ser escurridos. - - - - -

20. b) Después del escurrido precedente, se ponen de nuevo los órganos en suspensión en 30 l de tampón acetato 0,3 M, pH 4,2 a $+4^{\circ}\text{C}$ y se somete el conjunto a una agitación suave durante 3 horas a $+4^{\circ}\text{C}$. Se escurre a continuación y se eliminan los órganos. El filtrado es entonces pasado por el clarificador para eliminar las finas partículas en suspensión. Se recoge el extracto clarificado. - - - - -

25. c) Se adicionan a este extracto 250 g/l de sulfato

de amonio cristalizado. Se agita hasta disolución completa, después se deja reposar una noche a +4°C. El precipitado es recogido en el clarificador y las aguas madres son eliminadas. Se pone de nuevo, a continuación, en solución por agitación 1 hora en 8 l de tampón acetato 0,1 M, pH 4,2 a +4°C. El pH de la solución es entonces elevado de nuevo a pH 7,5 con sosa concentrada. - - - - -

5.

d) A la nueva toma a pH 7,5 precedente, se adicionan 64 g/l de sulfato de amonio cristalizado, después se ajusta el pH a 7,2 con ácido acético. Se deja reposar 30 minutos a +4°C. Después del paso por el clarificador, el precipitado inactivo es eliminado y la solución clarificada es ajustada a pH 6,5. - - - - -

10.

e) Se adicionan entonces a esta solución 72,5 g/l de sulfato de amonio manteniendo el pH con sosa N. Se agita hasta disolución completa y después se deja reposar 1 hora 30 minutos a +4°C. Después de clarificación, la solución es eliminada. Se lava el precipitado sobre el clarificador por paso de 2,5 l de agua destilada neutra. - - - - -

15.

f) El precipitado precedente es a continuación digerado en 500 ml de agua destilada. - - - - -

20.

Se adiciona ácido acético diluido hasta la obtención de un pH 4,3 estable, después se agita 1 hora a +4°C. Después de centrifugación, el insoluble de la nueva toma es eliminado y el sobrenadante diluido 5 a 8 veces con agua des-

25.

tilada hasta que tenga una resistividad de 600 a 650 ohmios.

5. El pH del sobrenadante de nueva toma es entonces elevado de nuevo a pH 6,3 - 6,5 con sosa 0,5 N, la resistividad pasa a 450 ohmios. El precipitado formado es inmediatamente recogido por centrifugación y el sobrenadante eliminado. - - - - -

10. Se dispersa este precipitado en 200 ml de tampón fosfato M/15, pH 7,2 a +4°C, después se eleva de nuevo de pH a 9,5 - 10 con sosa 3 N. Se agita vigorosamente 20 minutos, antes de llevar de nuevo el pH a 7,3 con ácido fosfórico diluido. Se deja reposar 30 minutos y se centrifuga. - - - - -

El insoluble es a continuación eliminado y el sobrenadante es pasado por una columna que contiene un soporte de tipo AH-Sépharosa 4B. - - - - -

15. Después de dosificación de las proteínas (entre 2,5 y 3 mg/ml) se adiciona entonces 2 veces el peso de proteínas de glicocola, después se dosifica la actividad. Se obtienen en esta fase 0,5 a 0,6 g de proteínas que titulan entre 3000 y 4000 u.CTA/mg. - - - - -

20. Después de dosificación de las proteínas y de la actividad, a la fracción activa se le adiciona sulfato de dextrano. El pH de la solución es entonces progresivamente bajado con ácido fosfórico diluido a pH 5,8 - 5,9. Se deja en reposo 30 minutos a +4°C, después se centrifuga. Se recoge el precipitado y se elimina el sobrenadante. El complejo es en-
- 25.

tences disuelto en un tampón a pH 7-7,5, después liofilizado.

Se dará a continuación el modo operatorio y los métodos de dosificaciones empleadas para medir los resultados experimentales. - - - - -

- 5. El reconocimiento "in vivo" de la actividad fibrinolítica de un activador puede efectuarse en el ratón midiendo el tiempo de lisis de las euglobulinas plasmáticas. Esta técnica de realización simple, reproducible, aplicable a pequeños animales de laboratorio, está adaptada al mecanismo de acción del producto a estudiar. - - - - -
- 10.

Principio:

El tiempo de lisis del coágulo de las euglobulinas del plasma es un método sensibilizado que permite apreciar una actividad lítica global. - - - - -

- 15. Bajando la fuerza iónica del plasma por dilución en agua destilada a pH ácido, se precipitan las euglobulinas, mientras que las pseudoglobulinas permanecen en el sobrenadante. - - - - -

- 20. En este sobrenadante están también eliminadas, las antiplasminas inhibidoras de la fibrinólisis (por lo que se obtiene una mayor sensibilidad del método). Entre las euglobulinas precipitadas se halla de nuevo la casi totalidad del fibrinógeno, plasminógeno y del activador del plasminógeno. - -

Técnica:

Extracción:

Sangre recogida sobre citrato trisódico 5,5 H₂O al 3,8% en la relación 1/5. (Desde su extracción la sangre debe mantenerse en hielo fundente y el examen ser practicado en la hora que sigue a la extracción). Se obtiene plasma por centrifugación a alta velocidad durante 10 minutos. - - - -

5.

Reactivos:

- Tampón Michaelis pH 7,35 (proporcionado por los laboratorios STAGO) - - - - -

10.

- Acido acético, solución al 1,6% diluido al 1/100 extemporáneamente con agua destilada enfriada a 4°C. - - - - -

- Solución de Thrombase con 20 Unidades Mellanby por ml, en cloruro de calcio 0,05 M. Una ampolla de Thrombase ECUSSEL que contiene 500 Unidades Mellanby es tomada de nuevo con 25 ml de CaCl₂ 0,05 M. CaCl₂ 0,05 M (5 ml de CaCl₂ 0,25 M (STAGO) + 20 ml de agua destilada). - - - - -

15.

La solución de Thrombase así preparada es repartida en fracciones de 2 ml que se conservan en el congelador y son descongeladas extemporáneamente. - - - - -

20.

Método:

. En un tubo de centrifugar cónico, introducir 0,5 ml de plasma

- . adicionar lentamente y agitando 9,5 ml de solución de ácido acético a 0,016% enfriado a 4°C - - - - -
- . mezclar revolviendo sobre parafina - - - - -
- . dejar reposar 20 minutos a 4°C - - - - -
- 5. . centrifugar 10 minutos a 3500 vueltas/minuto - - - - -
- . eliminar el sobrenadante - - - - -
- . securrir los tubos revolviéndolos sobre papel filtro - - -
- . secar cuidadosamente las paredes del tubo evitando alcanzar el precipitado aplicado en el fondo del tubo - - - - -
- 10. . tomar de nuevo el residuo de euglobulinas con 0,5 ml de Tampón Michaelis - - - - -
- . después de disolución completa tomar 0,25 ml de la solución de euglobulina en un tubo para hemolisis - - - - -
- . llevar al baño maría a 37°C - - - - -
- 15. . recalcificar con 50 μ l de Thrombase cálcica (a 20 U/ml) - -
- . disparar el cronómetro desde que la coagulación se ha producido - - - - -
- . observar regularmente el coágulo y anotar el tiempo que ha pasado hasta su completa desagregación (aspecto de copos de nieve en un líquido claro). - - - - -
- 20.

Experimentación animal:

En ratas macho naturales "Iffa-Credo" en ayunas desde aproximadamente 16 horas, de un peso comprendido entre 180 y 250 gramos según las experimentaciones, se reparten en

5. lotes testigo y tratados homogéneos. - - - - -

Las ratas testigo reciben por inyección en la vena del pene 1 ml por 100 gramos de peso corporal, de tampón fosfato pH 7,2 o de suero fisiológico según que el producto a estudiar esté disuelto en el uno o el otro de estos vehículos.-

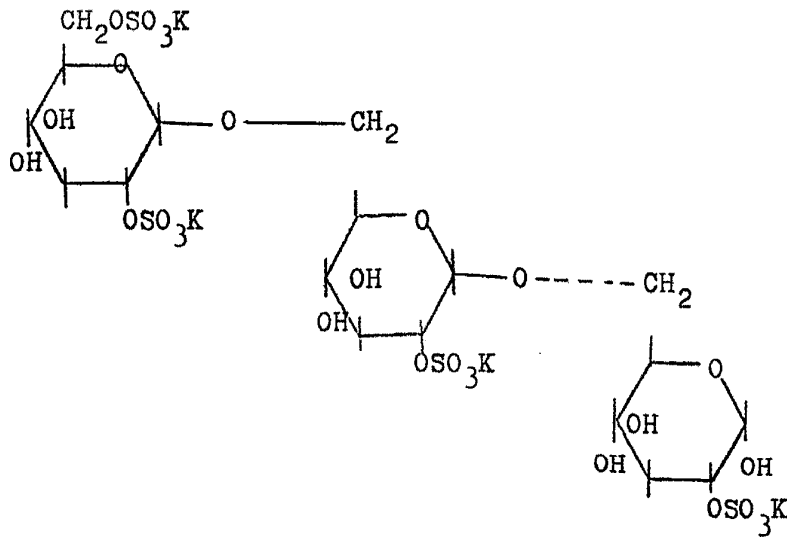
10. Las ratas tratadas reciben por inyección en la vena del pene 1 ml por 100 gramos de peso corporal del producto a estudiar en solución a la concentración necesaria para obtener la psicología deseada. - - - - -

15. Exactamente 15 minutos después de las diversas inyecciones, las ratas son ligeramente anestesiadas con éter, se les abre el tórax y la sangre es extraída por punción directa en el ventrículo. Entonces es tratada según la técnica descrita precedentemente. - - - - -

Los resultados obtenidos se dan a continuación. -

20. El sulfato de dextrano utilizado en los ensayos es el hidro-dextrano potásico de fórmula: - - - - -





Ensayo 1: Actividad propia del sulfato de dextrano

	<u>Tiempo de lisis</u>						<u>Media</u>
<u>Testigos</u>	115	120	85	108	115	108	108,5
<u>Sulfato de dextrano</u> 1 mg/kg	73	120	110	110	50	120	97,1
<u>Sulfato de dextrano</u> 2 mg/kg	93	105	100	95	90	108	98,5

Como se puede constatar, el sulfato de dextrano a las dosis experimentadas no presenta actividad significativa.

10.

Ensayo 2:

Actividades comparadas del activador solo y de la asociación según la invención. - - - - -

Para el conjunto de los ensayos, las dosificaciones indicadas para el activador son dosificaciones en proteínas. -

Este ensayo ha sido realizado a oscuras. - - - - -

	<u>Tiempo de lisis en mn</u>						<u>Media % acción</u>	
<u>Testigos</u>	120	155	120	135	130	-	128	-
<u>Activador 10 mg/kg</u>	70	85	100	100	85	92	88,7	30,7
5. <u>Activador 10 mg/kg</u> <u>+ sulfato de dextrano</u> 2 mg/kg	65	52	45	45	35	-	48,4	62,1

La solución según la invención es, de manera significativa, dos veces más activa que la solución de activador solo. - - - - -

10.

Ensayo 3:

	<u>Tiempo de lisis en mn</u>						<u>Media % acción</u>	
<u>Testigos</u>	145	135	130	145	150	140	140,8	-
<u>Activador 5 mg/kg</u>	125	115	120	105	110	-	115	18,3
15. <u>Activador 5 mg/kg +</u> <u>Sulfato de dextrano</u> 1 mg/kg	85	100	85	70	75	100	85,8	39

Los resultados son los mismos que en el ensayo 2. -

Ensayo 4:

	<u>Tiempo de lisis en mn</u>						<u>Media % acción</u>	
20. <u>Testigos</u>	83	80	75	65	95	-	79,6	-
<u>Activador 5 mg/kg</u>	67	100	100	69	70	85	81,2	-
<u>Activador 5 mg/kg +</u> <u>Sulfato de dextrano</u> 1 mg/kg	48	53	48	55	55	50	51,5	35,1

A la dosis utilizada, ni la fracción activa, ni el sulfato de dextrano utilizado presentan actividad significativa, por el contrario su asociación hace aparecer una buena actividad significativa del orden del 35%. - - - - -

5. Ensayo 5: Comparación entre la actividad de la asociación simple y del complejo según la invención. - - - - -

	<u>Tiempo de lisis en mn</u>						<u>Media</u>	<u>% acción</u>
<u>Testigos</u>	145	140	135	103	-	-	130,75	-
10. <u>Complejo</u>	85	70	95	75	95	90	85	35
<u>Asociación</u>	85	80	85	95	80	-	85	35

Se constata que las actividades de la asociación simple y del complejo son prácticamente semejantes. - - - - -

15. De los ensayos precedentes destaca netamente que la asociación de un polisacárido sulfatado y de un activador del plasminógeno constituye un medicamento de elección para el tratamiento de numerosos accidentes circulatorios tales como las trombosis arteriales o venosas en particular. - - - - -

N O T A

20. Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - - - -

R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- Perfeccionamientos en el objeto de la patente de invención nº 432.404, por Procedimiento de obtención de un

activador del plasminógeno, caracterizados porque a un activador del plasminógeno obtenido según la patente principal se le adiciona un polisacárido sulfatado. - - - - -

5. 2.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados porque el polisacárido sulfatado es un sulfato de dextrano. - - - - -

10. 3.- Perfeccionamientos según la reivindicación 2, caracterizados porque el sulfato de dextrano utilizado tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 3000 y 15000 y contiene entre aproximadamente 10 y 20% de azufre. - -

4.- Perfeccionamientos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados porque el polisacárido sulfatado es utilizado en cantidad comprendida entre 10 y 30% en peso del activador dosificado en proteína. - - - - -

15. 5.- Perfeccionamientos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizados porque el activador del plasminógeno y el polisacárido sulfatado están en forma de complejo. - - - - -

20. 6.- Perfeccionamientos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizados porque el activador del plasminógeno se prepara por tratamiento de un polvo acetónico de órganos animales elegidos entre los pulmones y riñones de cerdos, terneras, bueyes, caballos, corderos u ovejas o los ovarios de porcineas, bovinos u ovinos, por: - - - - -

a) puesta en suspensión del polvo acetónico en un tampón acetato que tenga una fuerza iónica comprendida entre 0,01 y 0,1 a un pH próximo a la neutralidad; - - - - -

5. b) nueva toma del precipitado obtenido en la etapa a) en un tampón acetato que tenga una fuerza iónica comprendida entre 0,6 y 1 a un pH comprendido entre 3 y 5; - - - - -

c) precipitación de la solución obtenida después de decantación en la etapa b) por adición de una sal a un pH comprendido entre aproximadamente 3 y 5; - - - - -

10. d) nueva toma del precipitado obtenido en la etapa c) en un tampón acetato y precipitación por adición de una sal a un pH comprendido entre 7 y 8; - - - - -

15. e) precipitación de la solución obtenida después de clarificación en la etapa d) por adición de una sal en la proximidad de la neutralidad; - - - - -

f) purificación del precipitado obtenido. - - - - -

20. 7.- Perfeccionamientos según la reivindicación 6, caracterizados porque la sal utilizada para la precipitación en las etapas c), d) y e) es el sulfato de amonio cristalizado. - - - - -

8.- Perfeccionamientos según la reivindicación 7, caracterizados porque el sulfato de amonio, en la etapa c), se utiliza a una concentración comprendida entre 200 y 300 g/l

y en las etapas d) y e) a una concentración comprendida entre aproximadamente 60 y 80 g/l. - - - - -

5. 9.- Perfeccionamientos según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizados porque la etapa de purificación se conduce por precipitación del activador a un pH comprendido entre 6,3 y 6,5 y por cromatografía de afinidad del precipitado obtenido después de nueva puesta en solución. - -

10. 10.- Perfeccionamientos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizados porque el activador del plasminógeno y el polisacárido sulfatado se preparan en forma de complejo por adición del polisacárido sulfatado con el activador en solución a un pH próximo a la neutralidad, y después precipitación del complejo por acidulación de la solución hasta un valor próximo a 6. - - - - -

15. 11.- "PERFECCIONAMIENTOS EN EL OBJETO DE LA PATENTE DE INVENCION Nº 432.404 POR PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO". - - - - -

20. Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de veintiuna hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

BARCELONA, - 5 MAYO 1976

P. A. M. CURELL SUÑOL

