

AÑO 1959

Expediente núm.



249670

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCIÓN

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una PATENTE DE INVENCIÓN por VEINTE años, en España

a favor de

AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION

, de nacionalidad

norteamericana domiciliado en 22 East 40th Street,

~~cdlx~~ Nueva York, N.Y., E.U.A. ~~cdlx~~

por:

UN METCDO DE PURIFICAR MOVILIZADORES LIFIDOS"

23 JUN. 1959

A-40.610 Case 741.229 AMS
(AMS)

249670



1959

249670

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

ESPAÑA

por VEINTIUN años

a nombre de AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION, entidad nortea-
mericana, establecida en 22 East 40th Street, Nueva York, N.Y.,
Estados Unidos de América, por:

"UN METODO DE PURIFICAR MOVILIZADORES DE LIPIDOS"

Este invento se refiere a un método de purificación de
un movilizante de lípidos dializable, contenido en la sangre
de los mamíferos.

5 Este movilizante de lípidos se obtiene sometiendo a un ma-
mífero a una excitación no específica, por ejemplo, mediante in-
yección de cortisona, separando después sangre del animal exci-
tado, separando el plasma o suero de la sangre entera, dializan-
do el plasma o suero frente a agua y secando por congelación el
dializado. Aunque el producto así obtenido es un movilizante
10 poderoso de lípidos, contiene cantidades considerables de mate-
rial inerte.

249670



Uno de los objetos de este invento es proporcionar un método de separación selectiva del material inerte y obtener el -
movilizante de lípidos en una forma muy purificada y potente.

De acuerdo con el presente invento, se crea un método de
5 purificación de movilizante de lípidos contenido en el dializa-
do de plasma sanguíneo obtenido a partir de la sangre de mamífe-
ros excitados no específicamente que comprende: la adición a una
solución acuosa del soluto dializado en porciones sucesivas un
alcohol alifático inferior, soluble en agua, la separación del
10 precipitado formado en cada adición de alcohol, el ensayo bioló-
gico de una muestra de cada precipitado y la recuperación del -
precipitado que presenta una actividad mejorada como movilizante
de lípidos.

Hemos descubierto que esto puede conseguirse mediante la
15 adsorción del movilizante de lípidos, designado aquí en lo que
sigue como M.L., a partir del dializado de plasma o suero en un
adsorbente apropiado, la disolución del adsorbente en un no di-
solvente orgánico para el M.L., la separación del M.L. sin disol-
ver por ejemplo por centrifugación, y la purificación posterior
20 del residuo sólido recuperado mediante fraccionamiento con di-
solvente o cromatografía de reparto o mediante ambos métodos.

Pueden utilizarse diversos adsorbentes, solubles e insolu-
bles, Como adsorbente soluble en los disolventes orgánicos e -
insoluble en agua, hemos encontrado particularmente útil el áci-
25 do benzoico. Pueden emplearse otros ácidos orgánicos sólidos -
insolubles en agua, como por ejemplo el ácido ftálico. La ace-
tona es un disolvente apropiado para el adsorbente y no disolven-
te para el M.L. Otros disolventes adecuados para esta fase que -
no son disolventes para el M.L., son el eter etílico, cloroformo,
30 dioxano, metiletiletona, tetrahidrofurano y análogos.

249670



Por otra parte, puede emplearse un adsorbente insoluble como, por ejemplo, polvo de celulosa ("Solka Floc", de la Brown Co), un producto de tierra de diatomeas ("Myflo Supercel", Johns-Manville), o una resina adecuada cambiadora de cationes ("Dowex" 50, 200-400 mallas, Dow Chemical Co.). En el último caso, el H.L. se eluye del adsorbente utilizando una técnica de gradiente, mediante agua o formiato acético acuoso 0,3-1,0 M ó, en el caso de una tierra de diatomeas o un adsorbente de celulosa, mediante un alcohol acuoso acidulado como, por ejemplo, una solución acuosa de n-butanol y ácido acético.

Para la fase de fraccionamiento con disolvente, hemos encontrado apropiado el etanol acuoso, aunque pueden utilizarse otros disolventes miscibles con el agua como el metanol y n- e i-propanol.

Para la preparación de tandas pequeñas en el laboratorio, la primera fase de adsorción puede omitirse y el residuo seco por congelación del dializado del plasma acuoso puede fraccionarse directamente mediante el empleo de disolventes precipitantes apropiados miscibles con el agua, por ejemplo, etanol acuoso.

Para obtener un producto de pureza aun mayor, el material resultante del fraccionamiento por disolvente puede cromatografiarse, por ejemplo, en una columna de celulosa. De este modo puede obtenerse un producto cristalino de potencia elevada.

Los ejemplos siguientes de formas de realización del invento se pretende que sean solamente aclaratorios y que no limiten su campo.

Ejemplo 1

Se tuvieron caballos en ayunas durante 24 horas y se les inyectó por vía intramuscular 21-acetato de 11-dihidro-17-hidroxiprogesterona a razón de 5 mg/kg de peso de cuerpo. Cuatro



249670

horas más tarde, se decantaron asépticamente por la vena yugular, recibiendo la sangre en una parte de citrato trisódico 0,1 M por cada 9 partes de sangre total. La sangre se guardó a 5° C. durante 72 horas para permitir la sedimentación de las células. El plasma decantado se dializó, en recipientes estériles cerrados, a través de una membrana "No-Jax", lavada previamente con 0,5% de fenol y agua desmineralizada estéril, libre de pirógenos, en un volumen igual de agua estéril desmineralizada durante 72 horas a 25° C. con agitación constante.

50 ml (equivalentes a 12 g. de peso seco) de dializado - se ajustaron a pH 3,5 con HCl 2 N y 20 ml. de una solución de ácido benzoico al 20% en acetona se añadieron lentamente a temperatura ambiente con agitación. El precipitado de ácido benzoico se agitó en la solución durante 1 hora, aproximadamente, y a continuación se separó por filtración. El precipitado que comprende el M.L. adsorbido, se lavó 2 veces con 50 ml. de agua y se disolvió, a continuación, en 20 ml. de acetona, en la que es insoluble el principio activo M.L. El residuo se separó por centrifugación.

10 g. de material inactivo se separaron en el primer - filtrado y 0,4 g en las aguas de lavado. Toda la actividad - M.L. está contenida en el precipitado de 25 mg. insoluble en acetona. Este material presenta una movilización mejorada de - lípidos en la rata. Este material puede purificarse después por los métodos de los ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 2

El dializado de sangre obtenido según se describió en el ejemplo 1, se secó por congelación.

23 g. del residuo sólido (que tenía una actividad 1-5 mg/kg)



249670

en la rata) se disolvieron en 100 ml. de agua. Este residuo contenía, aproximadamente, 90-95% de material inerte formado principalmente por sales de la sangre. La solución ligeramente amarilla se filtró, se ajustó a pH 3,5-4,0 mediante la adición de HCl 4 N, se diluyó hasta 125 ml y se enfrió a aproximadamente a -5° C. El ajuste del pH es importante para obtener un buen rendimiento y purificación. Se añadió a continuación etanol absoluto en porciones sucesivas a una muestra de 20 ml. de la solución y el precipitado resultante se separó después de cada adición. Finalmente, se añadió éter. Cada precipitado se secó separadamente en un desecador de vacío y se ensayó biológicamente. Los resultados se indican en la siguiente Tabla I.

TABLA I

Material de partida	Material añadido	Concentración final de etanol vol%	Peso del precipitado.	Actividad M.L. (ratas)
20 ml.	80 ml. EtOH	80	0,290 g	Inactivo
(Solución = 3,68 g de soluto)	20 " "	83	0,512	"
	80 " "	90	0,620	"
	200 " "	95	0,170	Activo a 20-50 γ/kg.
	600 " Et ₂ O	-	1.750	Inactivo
Total			3.342 g.	

Una nueva serie de resultados se presenta en la Tabla II:



249670⁰⁰

TABLA II

<u>Material de partida</u>	<u>Material añadido</u>	<u>Concentración final de etanol vol. %</u>	<u>Peso del precipitado.</u>	<u>Actividad M.L (ratas)</u>
125 ml.	625 ml EtOH	83	-	Inactivo
(solución ≅ 23 g de soluto)	500 " "	90	-	"
	1250 " "	95	350 mg	Activo a 25-50 γ kg.

5

10

Por otra parte, puede utilizarse como material de partida el producto del ejemplo I.

Ejemplo 3

15

La purificación posterior de la fracción en etanol al 95% obtenida como en el ejemplo 2, puede efectuarse por cromatografía.

Se prepara una columna de polvo de celulosa de un diámetro de 3,3 cm. y longitud de 32 cm. del modo que sigue:

20

Se trata "Solka Floc BW 200" (de la Brown Co, Berlin, N.H.) en porciones de 100 g. con porciones de 3 l de HCl 0,1 N, agua y ácido acético 0,1 N. Una columna tubular de vidrio de las dimensiones anteriores se rellena de una suspensión de 50 g. de la celulosa tratada que se escurre y rellena mediante la aplicación de presión positiva de aire.

25

Se prepara una solución de 300 mg del precipitado en etanol al 95% (obtenido como en el ejemplo 2) en 25 ml de ácido acético 0,1 N y se adsorbe en la celulosa haciéndola pasar a través de la columna a una velocidad de 1-1,2 ml. por minuto. La columna se eluye a continuación con n-butanol; ácido acético: agua 4:1:5 a la misma velocidad, recogiendo fracciones a los 10 minutos.

30

El material activo sale, en forma de zona reducida que da ensayo



20 JUL

249670

positivo con ninhidrina, en el intervalo aproximado de 180-220 ml de eluato.

Las fracciones positivas con ninhidrina se combinan y se secan por congelación. A partir de 300 mg de material de partida se obtienen, aproximadamente, 210 mg de un sólido amorfo amarillento, activo en la rata a una concentración de 10 γ /kg.

Ejemplo 4

Con objeto de obtener el producto principal activo en forma cristalina, el M.L. obtenido como se indicó anteriormente se volvió a cromatografiar utilizando el mismo sistema "Solka Flocc" pero a una velocidad de paso más lenta -0,5 ml/minuto y recogiendo fracciones más reducidas-, esto, es, a intervalos de 5 minutos. De este modo, la fracción de unos 350-375 ml. de eluyente produjo una coloración amarilla intensa con ninhidrina. Por evaporación de esta fracción particular, se obtuvieron agujas prismáticas incoloras que se recristalizaron una vez de etanol-agua. Esta fracción presentó una actividad V.L. máxima en la rata.

Esta fracción se desplazó en forma de mancha única en la cromatografía de papel según la técnica descendente en butanol: ácido acético: agua 4:1:5. En la electroforesis esta fracción se desplazó asimismo en forma de mancha única hacia el ánodo. El sistema amortiguador fue ácido fórmico: ácido acético 1:1, pH 1,9

La hidrólisis de este producto con HCl 6 N a 100° C. durante 15 horas produjo una serie de diferentes aminoácidos, de los que pudieron identificarse alanina, glicina, leucina, ácido glutámico y lisina; estos se separaron e identificaron cualitativamente mediante cromatografía de papel.

La actividad en la rata se determinó como sigue: se utili-



249670

zaron para todos los ensayos ratas, macho y hembra, de la raza Wistar. Las ratas se tuvieron en ayunas durante 18 horas antes de utilizarlas en el ensayo. El material a ensayar se preparó en solución fisiológica de sal. Los animales se inyectaron con el compuesto por la vena safena recurrente. Dos horas después, las ratas se anestesiaron con éter, se abrió el tórax y se obtuvo una muestra de sangre del ventrículo izquierdo. La sangre se diluyó 1:9 con citrato sódico 0,1 M y, a continuación, se centrifugó a 5° C. hasta que tuvo lugar la separación del plasma. La densidad óptica del plasma se determinó en un espectrofotómetro Beckman, modelo B., a 6.500 Å. Se determinaron las concentraciones de colesterol en sangre mediante una modificación del método Bloor (Proc. Soc. Expt. Biol. and Med. 1953, v.83, 468-473). La hiperlipemia producida por la administración de cantidades eficaces de M.L. se indica por un marcado incremento en la densidad óptica del plasma en comparación con los controles.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 11 de junio de 1958, bajo el número - 741.229, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta patente de invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.-Un método de purificar novilípidos de lípidos contenido en el dializado de plasma sanguíneo obtenido de la sangre de mamíferos excitados de modo no específico, que comprende; la adición a una solución acuosa del soluto dializado en porciones -

249670



5 sucesivas de un alcohol alifático inferior soluble en agua, separación del precipitado formado en cada adición de alcohol, ensayo biológico de una muestra de cada precipitado y recuperación del precipitado que presenta actividad movilizante de lípidos aumentada.

10 2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la adición de etanol a dicha solución del soluto dializado en porciones sucesivas a un pH de 3,5-4,0 hasta una concentración de etanol del 90% en volumen, separación de los precipitados inactivos resultantes, adición de más etanol a la solución residual hasta una concentración del 95% en volumen y recuperación del precipitado resultante, con lo cual se obtiene un material sólido que tiene una potencia muy aumentada como movilizante de lípidos.

15 3.- Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende la separación del soluto del dializado mediante adsorción del soluto dializado en un ácido orgánico insoluble en agua en suspensión, separación del ácido orgánico y soluto adsorbido del dializado acuoso, disolución del ácido orgánico en un no disolvente orgánico para el movilizante de lípidos activo, obteniendo con ello el soluto adsorbido insoluble en forma de suspensión, separando el soluto insoluble de la solución del ácido orgánico, disolviendo el soluto separado en agua y precipitando fraccionadamente un producto de actividad mejorada mediante las citadas adiciones sucesivas de un alcohol alifático inferior.

20 4.- Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el ácido orgánico es ácido benzoico y el no disolvente orgánico para el movilizante de lípidos activo es acetona.

30 5.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que



2496702

comprende la separación del soluto del dializado mediante ad-
sorción del soluto dializado debilmente acidulado en un sólido
insoluble amorfo, que tenga la propiedad de adsorber selectiva-
mente el movilizante de lípidos a partir de una solución acuosa
5 del mismo que contenga sales inorgánicas de la sangre, la
elución fraccionada del movimiento de lípidos a partir del adsor-
bente con un alcohol alifático inferior acuoso debilmente aci-
dulado y la recuperación de una fracción del eluato que tenga
actividad movilizante de lípidos aumentada.

10 6.- Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el
que el adsorbente es celulosa pulverizada, tierra de diatomeas
o una resina cambiadora de catión.

15 7.- Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2,
que comprende la purificación del precipitado obtenido en eta-
nol al 95% en volumen disolviendo dicho precipitado en ácido -
acético 0,1 N, el paso de la solución resultante a través de -
una columna de celulosa purificada, lavada con ácido acético,
a continuación la elución de la columna con una corriente len-
ta de butanol-ácido acético diluido con agua, recoger el elua-
to en una serie de fracciones separadas, ensayar cada fracción
20 mediante la reacción con ninhidrina y secar por congelación -
las fracciones que presenten una coloración amarilla con ninhi-
drina, con lo cual se obtiene un movilizante de lípidos de po-
tencia elevada.

25 8.- Un método de purificar movilizadores de lípidos.

249670



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

Esta Memoria consta de once hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 23 JUN. 1959

P.A.

Alberto de Elizaburu,
Por Poder.