

268412

P. 20.921.-  
491 F/E



268412

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de UCLAF, entidad francesa, establecida en 35, Boulevard des Invalides, París, Francia, por:

"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE DERIVADOS DE LA HEPARINA"

5 La presente invención, en cuya realización han participado los Sres. Gérard Nomine y Robert Bucourt, tiene por objeto un procedimiento de preparación de productos de amidificación de la heparina, que tienen notablemente una proporción de 60 a 95% de los grupos carboxilos amidificados.

Estos nuevos productos se designarán en lo que sigue por la expresión "Heparinamidas"

10 Algunos de estos nuevos compuestos, y notablemente las N-metilheparinamidas, presentan propiedades fisiológicas útiles, en particular una actividad antilipémica elevada, estando

268412



prácticamente exentos de la actividad anticoagulante típica de los compuestos de esta familia de cuerpos.

5 En particular, la sal sódica de la N-metilheparinamida puede ser utilizada para el tratamiento de la hiperlipemia postprandial o crónica, de la hipercolesterolemia, de la aterosclerosis, de las esteatosis hepáticas y de las nefrosis lipídicas.

10 El procedimiento según la invención consiste en preparar, en primer lugar, un derivado funcional de la heparina, en hacer reaccionar después este derivado, bien sea con amoniaco para obtener una heparinamida simple o bien con una amina primaria para obtener el derivado N-alcoholado correspondiente.

15 En una primera forma de ejecución se prepara, como derivado funcional, un ester de alcohol inferior de la heparina sometiendo ésta, en forma de sal de amonio cuaternario de cadena larga, a la acción de un agente de esterificación correspondiente.

20 Es particularmente ventajoso utilizar, para la reacción de amidificación, el ester metílico de la heparina, al cual se llega fácilmente haciendo reaccionar el diazometano sobre la heparina en forma de sal de amonio cuaternario de cadena larga.

La reacción de amidificación por amoniaco se efectúa preferentemente en un medio acuoso.

25 La reacción con las aminas primarias, notablemente con la metilamina, es efectuada muy ventajosamente en un medio acuoso, pero se obtienen también buenos resultados -como se demuestra luego- operando en un medio anhidro, que puede estar constituido por un disolvente como la formamida.

30 Se preparan también por medio de las aminas primarias ta-

268412



les como la metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, butilamina, isobutilamina, ter-butilamina, etc., las N-alcohol heparinamidas correspondientes, a saber:

- N-metil heparinamida
- N-etil heparinamida
- N-propil heparinamida
- N-isopropil heparinamida
- N-butil heparinamida
- N-isobutil heparinamida
- N-ter-butil heparinamida, etc.

Resulta ventajoso realizar las reacciones de amidificación bajo enfriamiento, preferentemente a temperaturas comprendidas entre  $-30$  y  $+25^{\circ}\text{C}$ .

En el caso de la preparación de la N-metil heparinamida, una variante del procedimiento de invención consiste en preparar, en primer lugar, la heparinamida simple y en metilar ésta seguidamente en forma de sal de amonio cuaternario de larga cadena, con ayuda de diazometano.

El grado de amidificación de los carboxilos de los productos así obtenidos, depende de la naturaleza de la amina y de las condiciones operatorias, particularmente de la concentración en amina del medio, siendo el grado de amidificación generalmente más elevado cuanto más rico sea el medio en amina.

En una segunda forma de ejecución se prepara, como derivado funcional, un anhídrido mixto de heparina y de ácido fórmico, haciendo reaccionar la heparina en forma de sal de amonio cuaternario, de cadena larga, con un cloroformiato de alcohol inferior.

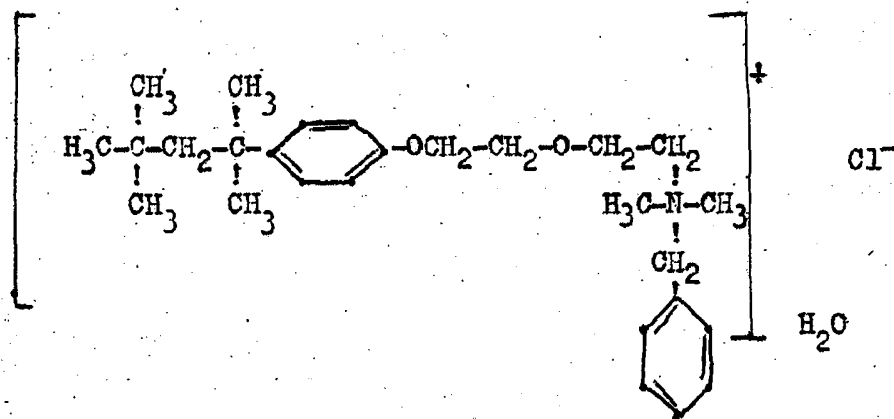
Se emplean ventajosamente como amonios cuaternarios de cadena larga, los productos siguientes:

268412



Cloruro de bencildimetil 2[2-(p-1,1,3,3-tetrametilbutilfenoxi,  
 etoxi] etil amonio, de fórmula empírica  $C_{27}H_{42}ClNO_2 \cdot H_2O$  y de  
 fórmula desarrollada:

5  
  
10



designado en lo que sigue por el término comercial "hiamina  
 1.622", la hiamina 2389 descrita en el "Index des huiles sul-  
 fonées et detergents modernes" de J.P. Sisley, II, p. 373, el  
 "Cequartyl BE" que figura en la página 287 del índice arriba  
 mencionado, y el "aquad 20", la página 261, o el "Zephirol",  
 la página 286, del mismo índice.

Preferentemente se elige como cloroformiato, el cloro-  
 formiato de etilo.

La reacción de amidificación puede ser llevada a cabo en  
 medio anhidro, pero da también muy buenos resultados operando  
 en presencia de una ligera cantidad de agua.

Esta segunda forma de ejecución, conduce a productos cu-  
 ya actividad antilipémica es tan elevada como la de los produc-  
 tos obtenidos por la primera forma, pero cuya actividad anti-  
 coagulante se reduce a la mitad con relación a dichos produc-  
 tos.

Los ejemplos siguientes se dan puramente a título de in-  
 dicación y no presentan ningún carácter limitativo.

268412



Las temperaturas se indican en grados centígrados.

Ejemplo 1: Preparación de una heparinamida (sal de potasio)

Etapa A: Ester metílico de heparina (sal de potasio)

5 a) Preparación de la sal ácida de himina de la heparina.

Se disuelven 40 g. de heparinato de sodio, solvatado al 7,2% en 160 cc. de agua, se añaden 10 cc. de ácido fórmico, después 810 cc. de una solución al 10% de himina 1.622.

10 La mezcla reaccionante se agita durante algunos minutos; se aspira a la trompa el producto precipitado, se lava con agua y se seca para recoger 86,8 g. (es decir 91,4%) de sal de himina ácida de la heparina.

b) Esterificación por diazometano.

15 Se disuelven 30 g. de sal ácida de himina de la heparina, en 300 cc. de cloruro de metileno, se enfría a 0 grados y se introducen lentamente 51 cc. de una solución clorometilénica que contiene 14,7 gramos de diazometano en 100 cc., y se deja en reposo la mezcla reaccionante durante 10 minutos a 0°. Se destila seguidamente a vacío el disolvente, se disuelve el residuo  
20 en 450 cc. de butanol saturado de agua, y se extrae la solución butanólica con una solución al 20% de acetato de potasio. Los extractos se vierten en etanol, se deja una hora en reposo, se aspira a la trompa, se lava el producto obtenido con etanol y con éter, y se recogen 12,86 g. del éster metílico de heparina, sal de potasio. El producto está solvatado al 4,4%. Se  
25 presenta en forma de un sólido blanco, insoluble en los disolventes orgánicos usuales como alcohol, éter, acetona, benceno, cloroformo, y es soluble en agua y álcalis en solución acuosa diluida. Se descompone en los ácidos en solución acuosa diluida.  
30 da.  $n_D^{20} = +45^\circ$  ( $d = 1\%$ , en agua).



238412

Análisis :  $C_{52}H_{73}O_{73}N_4S_{11}K_{11} = 2705$

Calculado: C% 23,08 H% 2,72 N% 2,07  $OCH_3$ % 4,6

Encontrado: 22,8-22,9 3,0-2,7 1,9 4,4

Este producto no se describe en la bibliografía.

5 De manera similar se prepara el ester metílico de la heparina, sal de sodio, utilizando una solución de acetato sódico en lugar de la solución de acetato de potasio, para extracción de la solución butanólica que contiene la sal de hiamina.

Etapa b) Amidificación.

10 Se saturan con gas de amoniaco, a +3°, 800 cc. de solución amoniacal de 22°Bé. Se añade con agitación, a +3°, una solución de 8 g. de ester metílico de heparina, sal de potasio, en 40 cc. de agua destilada, se satura de nuevo con amoniaco y se deja después en reposo durante 48 horas a cero grados. Se  
15 expulsa seguidamente el amoniaco por destilación a vacío, por debajo de 20 grados.

A la solución acuosa residual, se añade una solución de 16 g. de hiamina, 1622 en 160 cc. de agua destilada. La sal de hiamina precipitada se aspira a la trompa y se lava con  
20 agua, después se disuelve en butanol saturado de agua, y se extrae con una solución acuosa al 20% de acetato de potasio. Se vierten los extractos en etanol y se aspira a la trompa la sustancia precipitada, que se seca sobre anhídrido fosfórico. Se obtienen 7,08 g. de producto de un grado de amidificación  
25 de aproximadamente 72%, que presenta las características siguientes:

Solvatación: 7,75% - funciones ester: 0

Análisis:  $C_{48}H_{69}O_{69}S_{11}N_8K_{11} = 2645$

Calculado: C% 21,79 H% 2,62 N% 4,23 S% 13,33

30 Encontrado: 22,0-22,1 2,6 3,5-3,6 12,3



203412

Actividad fisiológica: Antilipémica: 116 U/mg., es decir corregido 136 U/mg. Anticoagulante: 25 U/mg., es decir corregido 30 U/mg.

Este producto no se describe en la bibliografía.

5

De manera similar, se prepara una heparinamida, sal de sodio, utilizando una solución de acetato de sodio en lugar de la solución de acetato de potasio, para la extracción de la solución butanólica conteniendo la sal de hiamina.

10

Ejemplo 2: Preparación de una N-metil heparinamida (sal de sodio) en medio anhidro.

15

Se condensa a  $-30$ ,  $-40^{\circ}$ , 30 cc. de monometilamina, se añade una solución enfriada a  $0^{\circ}$ , de 0,5 g. de ester metílico de heparina, sal de sodio, y 15 cc. de formamida. La mezcla reaccionante se mantiene a temperatura de  $-10$  y  $-15^{\circ}$ , durante dos horas. Se expulsa después a vacío el exceso de metilamina, después se añade una solución de 15 g. de hiamina 1622 en 100 cc. de agua. Después de una noche de reposo, se aspira a la trompa la sal de hiamina, que se introduce en 20 cc. de butanol saturado de agua. Se extrae con una solución acuosa al 20% de acetato de sodio, se vierten los extractos en alcohol y se aspira a la trompa la N-metilheparinamida, que se lava con alcohol y se seca sobre anhídrido fosfórico. Rendimiento 458 mg. (ó sea 88%) de producto solvatado al 13,1%.

20

25

Actividad antilipémica: 151 U/mg.

Actividad anticoagulante: 11 U/mg. (valores corregidos)

Índice de nitrógeno: 3,8% (siendo el valor teórico de 4,41%).

30

Según el porcentaje de nitrógeno, el índice de amidificación es de 71,5%.

Este producto no está descrito en la bibliografía.



3412

De manera similar, se prepara una N-metilheparinamida, sal de potasio, utilizando una solución de acetato de potasio en lugar de la solución de acetato sódico, para la extracción de la solución butanólica que contiene la sal de hiamina.

5 Ejemplo 3: Preparación de una N-metil heparinamida (sal de sodio) en medio acuoso.

Se hace burbujear la monometilamina en 25 cc. de agua mantenida entre 0 y + 5°, hasta que el volumen alcance los 50 cc., se añaden 0,5 g. de éster metílico de heparina, sal de sodio, y se agita la mezcla formada durante 2 horas a + 10°C.

10 Seguidamente se expulsa a vacío la metilamina, se añade una solución de 1,5 g. de hiamina 1622 en 100 cc. de agua y se deja luego a la temperatura ambiente durante una noche. Se aspira a la trompa, se disuelve el producto aspirado a la trompa en 20 cc. de butanol saturado de agua y se extrae con una solución de acetato de sodio. Se vierten los extractos en alcohol, se aspira a la trompa la N-metilheparinamida, que se seca sobre anhídrido fosfórico.

20 Rendimiento 478 mg. de producto (o sea 95,5%) solvatado a 9,95%  $\left[ \alpha \right]_D^{20} = + 50,7^{\circ} (c = 1\%, \text{ agua})$ .

Actividad antilipémica: 148 U/mg.

Actividad anticoagulante: 10,5 U/mg. (valores corregidos)

Análisis:  $C_{52} H_{77} O_{69} S_{11} N_{11} Na_{11} = 2\ 524$

Índice de azufre: 13,03% (Teoría : 13,97%)

25 Índice de nitrógeno: 4,1%

Según el porcentaje de nitrógeno, el índice de amidificación es de 85%.

Ejemplo 4: Preparación de una N-metil heparinamida (sal de potasio) por metilación de la heparinamida.

30 Se disuelven 2 g. de heparinamida, sal de sodio, obteni-



268412

da según el ejemplo 1, en 10 cc. de agua, se añaden 2 cc. de ácido fórmico, después 34 cc. de una solución al 10% de hiamina 1622. La sal ácida de hiamina que precipita, se aspira a la trompa y se lava con agua. Después se seca sobre anhídrido fosfórico, se disuelve en 50 cc. de cloruro de metileno, después se introducen 10 cc. de una solución de diazometano con una concentración de 11 g./litro. La mezcla reaccionante se deja durante algunos minutos y después se concentra a vacío. El residuo se recoge en 75 cc. de butanol saturado de agua, y se extrae con una solución acuosa al 20% de acetato de potasio. Se vierten los extractos en alcohol, se aspira a la trompa el precipitado, que se lava y seca para recoger 1,7 g. de producto solvatado al 7,1%, y que contiene 5,05% de acetato de potasio.

Porcentaje de nitrógeno: 3,5-3,6% (corregido, teoría: 4,23%)  
Actividad antilipémica: 125 U/mg.  
Actividad anticoagulante: 8,9 U/mg. (valores corregidos)

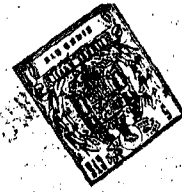
El porcentaje de nitrógeno confirma que el índice de amidificación del producto de partida, de 72%, ha permanecido constante en el producto obtenido.

De manera similar, se prepara una sal de sodio de N-metil heparinamida, utilizando una solución de acetato de sodio en lugar de la solución de acetato de potasio, para la extracción de la solución butanólica que contiene la sal de hiamina.

**Ejemplo 5: Preparación de una N-metil heparinamida.**

A una solución enfriada a temperatura de 0 a + 2°, conteniendo 0,3% de agua, de 6 g. de sal neutra de hiamina de la heparina, preparada según el modo operatorio descrito por la sociedad demandante en su patente francesa nº 1.261.870, en 120 cc. de tetrahidrofurano, se añaden 2 cc. de cloroformiato de etilo. Se agita durante 15 minutos a temperatura entre

268412



0 y + 2°: después se hace burbujear monometilamina de forma que se introduzcan 4 litros de gas en 15 minutos, enfriando para no sobrepasar nunca la temperatura de + 7°. Se agita todavía durante 45 minutos a temperatura de 0 a + 2°. Se destila a vacío hasta sequedad, a la temperatura ambiente. El residuo se disuelve en 80 cc. de butanol-n saturado de agua. Se efectúan 4 extracciones sucesivas, con 6 cc. de solución acuosa al 20% de acetato de sodio. Reunidos estos extractos, se tratan con 43 cc. de una solución de hiamina 1622 al 10%. Después de una hora de reposo se aspira a la trompa, se lava con agua, se recoge con 60 cc. de butanol saturado de agua, efectuando cada vez 3 extracciones con 6 cc. de solución acuosa de acetato de sodio al 20%.

El producto obtenido es blanco, insoluble en alcohol y en éter, soluble en agua y soluciones acuosas diluídas de ácidos o álcalis.

$$[\alpha]_D = + 55 \text{ a } 58^\circ \text{ (c = 1\%, agua)}$$

Indice de amidificación: 90%

Solvatación: 7,7%

Azufre: 13,75% (siendo el teórico de 13,98)

Actividad antilipémica: 179 unidades/mg.

Actividad anticoagulante: 41 unidades/mg.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Francia el 21 de Junio de 1960, bajo el núm. 830.651, y el 10 de Octubre de 1960, bajo el Núm. 840.757, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



- N O T A -

263412

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

10 1.º.- Procedimiento de preparación de derivados de la heparina denominados heparinamidas, conteniendo notablemente una proporción de 60 a 95% de los grupos carboxilos amidificados, caracterizado porque se prepara en primer lugar un derivado funcional de la heparina, se hace después reaccionar este derivado, bien con amoniaco para obtener una heparinamida simple, o bien con una amina primaria para obtener el correspondiente derivado N-alcoholado.

15 2.º.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se prepara, como derivado funcional, un ester de alcohol inferior, haciendo reaccionar la heparina en forma de sal de amonio cuaternario de cadena larga, con un agente de esterificación correspondiente.

20 3.º.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque como agente de esterificación se emplea el diazometano.

25 4.º.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se prepara, como derivado funcional, un anhídrido mixto de la heparina y de ácido fórmico, haciendo reaccionar la heparina, en forma de sal de amonio cuaternario de cadena larga, con un cloroformiato de alcohol inferior.

30 5.º.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 4, caracterizado porque se emplea como cloroformiato el cloroformiato de etilo.

268412



6º.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 4, caracterizado porque la amina empleada es metilamina.

5 7º.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 4, caracterizado porque la reacción del anhídrido mixto de la heparina con la metilamina se realiza en tetrahidrofurano, en presencia de una pequeña cantidad de agua.

10 8º.- Procedimiento de preparación de los derivados N-metilados de las heparinamidas simples, según la reivindicación 1, caracterizado porque se hace reaccionar el diazometano con dichas heparinamidas simples, en forma de sales de amonio cuaternario de cadena larga.

9º.- Procedimiento de preparación de derivados de la heparina.

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

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

Madrid,

P.A.

207 1951  
*[Handwritten signature]*