

PATENTE DE INVENCION

Ref. CIBA Case 4610/E.

270317



Memoria Descriptiva

sobre:

" Procedimiento para la obtención de un polisacaruro
nuevo "

=====

Solicitante: CIBA SOCIETE ANONYME, entidad Suiza, residente en
Basilea, Suiza.

=====

El objeto de la invención es la obtención
de un polisacaruro nuevo con efecto represor de tumores,
en forma pura, de material vegetal del *Viscum album*
(muérdago) o clases del *Loranthus*, especialmente *Loran-*
5. *thus europæus* L.



- El muérdago se emplea desde hace centenares de años en la medicina. En especial su efecto en la epilepsia y mareos ya fué observado por Plinius en el segundo siglo d.J. Ultimamente, los preparados de muérdago se emplean, además, en los casos de presión sanguínea elevada, en enfermedades de los vasos y en la aterosclerosis. Aquí se trata de extractos en bruto o los así llamados extractos completos. A estos se les atribuye un cierto efecto en las enfermedades del cáncer. Por esta razón no es asombroso que ya se intentaran obtener los principios activos del material vegetal del *Viscus album*. Además de la colina y acetilcolina, ursona y ciertos alcoholes de resina se aisló aquí, ante todo, la viscotoxina (K. Winterfeld y M. Leiner, *Naturwissenschaften*, 42,487 (1955)). Trátase aquí de un polipepturo que se caracteriza por su efecto sobre el corazón y además posee propiedades irritantes y necrotizantes. A estas propiedades necrotizantes de la viscotoxina se le atribuye el atrofiamiento de tumores de inyección observados en los ratones al aplicarse intratumoralmente los extractos completos de muérdago.
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.

- Las propiedades extraordinariamente tóxicas de la viscotoxina dificultan, sin embargo, la aplicación intravenosa de esta sustancia o de extractos totales, y el efecto de un tratamiento sistémico de esta clase sobre el crecimiento de tumores, en comparación con el tratamiento intratumoral prácticamente sin importancia, es, por lo menos, muy dudoso.
- 25.
 - 30.



Se ha descubierto ahora que del material vegetal *Viscum album* y clases de *Loranthus*, especialmente del muérdago de encina (*Loranthus europeus* L.), muy parecido al *Vuscum album*, se puede aislar un polisacaruro en forma pura al que nosotros hemos dado el nombre de ácido viscúmico.

5.

El ácido viscúmico se puede emplear para combatir tumores en forma sistémica, por ejemplo. intravenosamente y se caracteriza, por la falta del efecto sobre la presión de la sangre y otros efectos indeseados de los extractos completos del muérdago o de la viscotoxina.

10.

De acuerdo con nuestras investigaciones, el ácido viscúmico es un polisacaruro que, como han demostrado la disociación hidrolítica y las comprobaciones cromatográficas de papel de los productos disociados, se compone principalmente de galactosa y arabinosa y que además también contiene ramosa y un ácido urónico, posiblemente ácido glucorónico. El ácido viscúmico tiene un pK_g de 3,9 ($c = 1,1 \cdot 10^{-2}$ (Val/1)). El cociente de su peso molecular con el número de los grupos carboxílicos libres, determinado por titración de la solución acuosa, es de aproximadamente 1900. Por la cantidad de ácido carbónico liberado en la hidrólisis del ácido viscúmico en ácido clorhídrico al 12% (precipitado como $BaCO_3$ y pesado) éste cociente se calcula en aproximadamente 1500. El análisis elemental da el siguiente cuadro (Valor de 2 análisis: C 43,50; 43,73%, H 6,41; 6,07%, (C)-CH₃ 2,11; 1,99%; N máximo 0,2%). El ácido viscúmico se disuelve

15.

20.

25.

30.



270317

en agua y formamida dimetíllica. El espectro ultravioleta no muestra bandas de absorción, mientras que el espectro infrarojo (en nujol) está caracterizado por las siguientes bandas (en $m\mu$): máx. 2,93-3,00; 5,74; 6,08; escalon en 7,2 con máx. en 8,00 - 8,05.

5.

El giro óptico en agua (1,47% es después de clarificación por ultracentrifugado) para la línea sódica-D $[\alpha]_D^{25} = -26,7 \pm 1^{\circ}$; para las siguientes líneas de mercurio:

$$\begin{aligned} [\alpha]_{405} &= -59,5 \pm 1^{\circ} \\ [\alpha]_{436} &= -50,7 \pm 1^{\circ} \\ [\alpha]_{546} &= -31,0 \pm 1^{\circ} \\ [\alpha]_{578} &= -27,2 \pm 1^{\circ} \end{aligned}$$

10.

La constante de sedimentación (Sm) del ácido viscúmico neutralizado en solución de sal común al 2,67% a 20°, es de $3 \cdot 10^{-13}$ (c = 1,3%). La viscosidad relativa (η_{rel}) es de 1,39 (c = 0,44% en solución de sal común 0,1 mol. a 25°).

15.

El efecto represor de tumores del ácido viscúmico se comprobó en los siguientes tumores sólidos sobreinyectables: Tumores de ratón: Croker Sarcom 180, Ehrlich Carcinom (forma sólida) y Adeno-Carcinom EO 771. Tumores de ratas: Walker Carcinosarcom 256, Uterusepitheliom T-8 Guérin y Flexner-Joblin carcinom.

20.

El preparado se administró intraperitonealmente diariamente durante 6 días. Las soluciones acuosas se prepararon diariamente de nuevo. El efecto sobre el tumor se determinó 2 días después de terminado el tratamiento.



Los resultados están resumidos en la tabla siguiente:

Tumores	Potencia represora
Crocker Sarcom 180	+
Ehrlich Carcinom	+
Adenocarcinom EO 771	++
Walker Carcinosarcom 256	++
Uterusepitheliom T-8 Guérin	++
Flexner-Joblin Carcinom	+++

Explicación de los signos:

- 5. +++ fuerte efecto del tratamiento
- ++ mediano efecto del tratamiento
- + débil efecto del tratamiento

De esta tabla se desprende que el carcinoma seg. Flexner-Joblin es el que más fuertemente se puede reprimir. El Uterusepitheliom T-8 Guérin, el carcinoma seg. Walker 256 y el adenocarcinom EO 771 se restringen medianamente, apareciendo más destacado el efecto sobre este último.

15. Ulteriores ensayos han demostrado que no se restringe la haematopoesis. Las investigaciones citológicas hacen suponer que existe un efecto sobre los ácidos nucleínicos, posiblemente por influencia de los materiales de azúcar.



El procedimiento para la obtención del ácido viscúmico se caracteriza, porque el material vegetal del *Viscum album* o clases de *Loranthus*, especialmente el *Loranthus europaeus* L. se extrae con

5. agua o se prensa y a continuación el extracto o el jugo de prensado se somete a una diálisis. En esta diálisis pasan las materias activas, tal como por ejemplo, la viscotoxina, al dializado, mientras que se queda el ácido viscúmico. La parte no-dializable

10. obtenida del extracto contiene aún materiales lastres que se separan, obteniéndose el ácido viscúmico en forma pura, en caso dado, como sal metálica o como mezcla de ambas formas.

Como material inicial para la extracción con agua o la obtención del jugo de prensado se emplean, en primer lugar, las bayas maduras de las plantas mencionadas, ante todo del *Viscum album*, o también las hojas del mismo, Aquí se puede emplear las bayas enteras o solo los corazones o el sarcocarpio. Convenientemente se efectúa la extracción como extracción de agua fría. Los extractos se separan de los componentes sin disolver, ventajosamente mediante centrifugado.

15. El extracto respectivamente, jugo de prensa así obtenido se dializa a continuación. Convenientemente se emplean para ello las membranas semipermeables usuales, ante todo celofan, por ejemplo, mangas de celofan con un diámetro de poros de 2,5 - 8,0 m μ y se dializa contra agua de la red y finalmente contra agua destilada. La solución residual (no dializada)

20.

25.

30.



se concentra convenientemente a continuación. Esto se efectúa ventajosamente en vacío, posiblemente en un evaporador rápido o según el sistema de liofilización o mediante una combinación de estos métodos,

5. trabajándose primero con un evaporador rápido y seguidamente con un liofilizador. El extracto así obtenido contiene el ácido viscúmico, respectivamente, sus sales con los metales existentes en las planchas (por ejemplo, sodio, calcio, magnesio etc) en
10. forma enriquecida y posee ya un destacado efecto antitumoral.

Para el aislamiento del ácido viscúmico, respectivamente, sus sales, se pueden utilizar métodos distintos. Uno preferente es la precipitación fraccionada mediante disolventes orgánicos miscibles con agua. Tales son, ante todo, dioxano, alcoholes alifáticos bajos, por ejemplo glicoles, tal como glicol etilénico, glicol dietilénico, glicol propilénico, metoxietanol, éster monometílico del glicol dietilénico,

15. éter monoetílico del glicol dietilénico, monoacetato de glicol etilénico, glicol polietilénico, alcanoles especiales, tal como metanol o propanol, o cetonas, tal como cetonas alquílicas, por ejemplo. acetona o cetona metiletílica, ante todo, sin embargo,

20. etanol. La fracción deseada, que contiene el ácido viscúmico respectivamente, sus sales, se puede determinar fácilmente a base de su propiedad biológica represora de tumores.

- 25.
30. Con alcohol etílico por ejemplo, se obtiene el ácido viscúmico mediante adición de etanol a las



- soluciones acuosas y separación de la precipitación que se obtiene con una concentración de alcohol de 55-75%. El precipitado se puede separar en forma usual, por ejemplo, por centrifugado. La precipitación se puede repetir varias veces, pudiéndose así aumentar el
5. grado de pureza del ácido viscúmico, respectivamente, de sus sales. Las precipitaciones se pueden efectuar también en presencia de medios de absorción, tal como Hyflo o absorbentes parecidos, o en presencia de un
10. electrolito fuerte para facilitar la precipitación.

- Otro método para el aislamiento del ácido viscúmico puro o de sus sales consiste en la separación electroforética. Esta se efectúa en la forma usual, pudiéndose, también aquí, determinar la fracción deseada por su eficacia represora de tumores.
15. Por lo general se puede decir que el ácido viscúmico se encuentra en la fracción parada respectivamente, lentamente desplazable anódicamente, mientras que la fracción de marcha rápida se compone de las materias
20. lastre.

- Finalmente, el ácido viscúmico se puede limpiar también por precipitación de las materias acompañantes con un compuesto amínico cuaternario. Aquí se emplearán especialmente aquellos que contengan una
25. cadena de carbono larga con más de 8 átomos de carbono, por ejemplo cloruro cetil-trimetilamónico, cloruro cetil-etilo-dimetilamónico, cloruro cetil-dimetilbencilamónico, cloruro cetil-piridínico, cloruro (3 -fenoxi-etilo-dimetilo-dodecilamónico, o los correspondientes
30. bromuros, yoduros o hidróxidos.



- Ciertas materias acompañantes forman aquí complejos de difícil solubilidad en los compuestos amónicos cuaternarios, que se pueden separar en forma en si ya conocida, por ejemplo, por centrifugación. La cantidad del compuesto amónico cuaternario a agregar puede variar entre amplios márgenes, debiéndose tener solamente en consideración que no se agregue un exceso demasiado grande, ya que los compuestos complejos, que se forman, se disuelven entonces parcialmente. Los complejos formados se separan por centrifugación o filtrado y el filtrado, que contiene el material activo, se libera de la sal amónica en exceso mediante diálisis contra agua destilada. De la parte no dializable se obtiene, por liofilización, el material activo puro.
- También se pueden emplear los compuestos amónicos para la precipitación del ácido viscúmico respectivamente, sus sales, siempre que se trabaje en un tope de borato de un pH de aproximadamente 10.
- Según el procedimiento se obtiene el ácido viscúmico en forma libre o como sal o como mezcla de ambos. De las sales se puede obtener el ácido viscúmico libre en la forma usual, por ejemplo, mediante intercambiadores de cationes o con ayuda de la diálisis contra ácidos diluidos. De los ácidos libres se pueden obtener, en la forma usual, las sales metálicas, por ejemplo, de metales alcalinos o alcalinos terrosos.
- La invención se refiere también a aquellas formas de ejecución del procedimiento en las
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



317

- cuales el procedimiento de arriba se combina en cualquier forma y/o se completa por,ulteriores operaciones de limpieza o medios auxiliares o se sustituyen por procedimientos equivalentes o donde se emplean otros
5. materiales vegetales que contengan el ácido viscúmico.
- El ácido viscúmico y sus sales se pueden emplear como medicamentos en las enfermedades del
10. cáncer. Para ello se pueden presentar por ejemplo, en forma de preparados farmacéuticos que los contengan junto con materiales vehículo orgánicos o inorgánicos, farmacéuticos, adecuados para la aplicación parental. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar por ejemplo, como ampollas secas. En caso dado estarán
15. esterilizadas y/o contendrán materias auxiliares, tales como medios de conservación, estabilización, reticulación o emulsión, sales para variar la presión osmótica o topes. Asimismo pueden contener otros materiales terapéuticamente valiosos.
20. La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos. Las temperaturas están indicadas en grados Celsio.
- Ejemplo - 1.
25. 8 kg. de bayas de muérdago maduras se trituran entre cilindros de piedra y seguidamente se agitan en un recipiente, enfriado con hielo, con 12 litros de agua destilada fría como el hielo, durante 3 horas. Se ha de garantizar una agitación intensa mediante dos agitadores de contramarcha (Tifón) cuyas
30. aletas, sin embargo, no deben tener aristas vivas.



- De esta manera se disuelve lentamente el mucílago muy viscoso mediante esponjamiento y trituración mecánica. Se deja reposar durante breve tiempo, de manera que puedan sedimentar las pieles y los corazones de la
5. baya, y la solución viscosa se pasa a una centrífuga de saco de marcha no muy rápida. El aparato de extracción y la centrífuga se lavan ulteriormente con 3-5 litros de agua destilada fría. El centrifugado liberado de las partículas sólidas, pero aún turbio,
10. se llena en 10 mangas de celofan y primeramente se dializa contra un gran volumen de agua de la red, fría como el hielo, renovada continuamente, y seguidamente, cambiando por lo menos 6 veces, cada vez contra 200 litros de agua destilada fría como
15. el hielo. El dializado se desecha y las partes no dializables (el interior de la manga) se reúnen y a una temperatura de disolución de unos 30° se concentran en el evaporador rápido en vacío a 1,7 litros de Volumen. Mediante secado por congelación
20. se obtienen de esta solución altamente viscosa 240 g. de un preparado coposo, casi incoloro, (Prep. 22303 D), que contiene el ácido viscúmico en forma enriquecida y muestra un buen efecto antitumórico que se mantiene durante un tiempo ilimitado.
25. Ejemplo - 2.
- 400 g. del preparado 22303 D se disuelven, para aislar el ácido viscúmico, agitando intensamente durante 3 horas, en 6 litros de agua destilada fría como el hielo. Después se gotean durante un intervalo
30. de unas 3 horas en la mezcla bien agitada 12 litros



- litros de alcohol abs. y se sigue agitando aún durante 16 horas a 0°. La precipitación coposa, incolora se deja asentar y a continuación se decanta la solución amarilla superior, que contiene el azúcar y las polisacaruros de baja molecularidad. La
5. sedimentación se centrifuga entonces y el cuerpo sólido se lava en un filtro de vacío de cristal con 50 cm³ de alcohol acuoso al 75%. Seguidamente se disuelve el residuo mediante agitación intensa en 1,5 litros
10. de agua destilada a 0° y la solución altamente viscosa formada se libera de las partículas suspendidas mediante centrifugado (Centrifuga Laval). La solución clara se transforma por liofilización en 82 g. de un producto coposo incoloro de elevada actividad
15. antitumoral (Preparado 24 467 A). Este producto es el ácido viscúmico en mezcla con sus sales metálicas presentes en la planta.

Ejemplo - 3.

20. La mezcla de pieles de bayas y corazones, que se quedan en la extracción según el ejemplo 1 en la centrífuga de saco, se puede separar por suspensión en las pieles más ligeras y los corazones de las bayas relativamente duros, específicamente mas pesados y de color verde. De esta manera se obtienen
25. de 8 kg. de bayas aproximadamente 400 g. de corazones.

30. De estos se desmenuzan 100 g. en 150 cm³ de agua, se pasan a través de una capa de 40 g. de "Hyflo" Supercel, el residuo y el medio de filtración se lavan dos veces con 50 cm³ de agua destilada y el



filtrado se somete a la diálisis. Se dializa primera-
mente contra agua de la red fría como el hielo,
después contra agua destilada fría como el hielo (vea-
se el ejemplo 1). La parte no dializable que forma

5. unos 350 cm³ de volumen se concentra por evaporación
en vacío bajo condiciones benignas a 40 cm³ (contenien-
do aproximadamente 20 g. de materias sólidas). Esta
solución se mezcla según el ejemplo 2 agitando bien
con 80 cm³ de alcohol abs, y se obtiene así el pre-
parado 25 236 A, asimismo una mezcla de ácido viscúmico
10. y sus sales, con buen efecto represor de tumores.

Ejemplo - 4.

Al recoger las bayas de muerdago se ha
observado repetidas veces una infección del material
15. con microorganismos (p.e. bacilos de heno, etc) La
preparación de preparados libres de gérmenes se puede
efectuar mediante interconexión de un tratamiento
con formaldehído en lugar adecuado del procedimiento

- de enriquecimiento, por ejemplo sigue 400 g. del pre-
parado 22 303 D (vease ejemplo 1) se disuelven agi-
tando intensamente durante 3 horas a 0° en 6 litros
20. de agua destilada, se libera por centrifugación de las
reducidas cantidades de materiales en suspensión y
el ácido viscúmico se precipita mediante goteado de
25. 12 litros de alcohol abs, durante 3 horas y ulterior
agitamiento a 0° durante 16 horas. La separación del
filtrado amarillo de la precipitación se efectúa en la
forma descrita en el ejemplo 2. El residuo se disuelve
a continuación en 2 litros de agua destilada agitando
30. intensamente, se mezcla con 50 cm³ (40% en volumen)



de solución formalínica y se deja reposar durante 24 horas a temperatura de ambiente.

5. Después se dializa la solución contra 10 veces su volumen de agua destilada, bajo frecuente cambio, hasta que el dializado no forma ningún residuo más que huela a CH_2O . La solución esteril de la parte no dializable se liofiliza en un sistema de aparatos esterilizados, obteniéndose así 82 g. de preparado coposo, blanco puro, 26 327 que representa la mezcla del ácido viscúmico y sus sales metálicas y está libre de microorganismos.

Ejemplo - 5.

15. 20 g. del ácido viscúmico enriquecido, obtenido según el ejemplo 1, se agitan con 300 cm de agua destilada durante 1/2 hora y para eliminar el enturbiamiento se filtra a través de 5 g. de Hyflo Supercel y el filtro se lava ulteriormente. Las aguas de lavado se agregan a la solución y se obtiene un volumen de total 320 cm³. Después de agregar 20 g de Hyflo se vierten en esta solución, y agitando muy bien, en chorro fino 590 cm³ de alcohol abs. y se sigue agitando aún durante 15 minutos. Se deja sedimentar el Hyflo cargado con el precipitado y entonces se filtra a través de un filtro de cristal de sinterizado. Del residuo de Hyflo se retira el material polisacarúrico mediante extracción con agua.

20. El filtrado posee un volumen de aproximadamente. 900 cm³ y se mezcla nuevamente con 20 g. de Hyflo supercel. Después se introducen y agitan en la forma arriba descrita 370 cm³ de alcohol abs. y
- 25.
- 30.



270317

la precipitación se filtra en vacío. Para obtener la fracción polisacarúrica se extrae el residuo de Hyflo con agua.

5. El filtrado se concentra ahora por evaporación sobre el evaporador de rotación en vacío a un volumen de 200 cm³ y de la solución acuosa se precipita después de agregar 2^o g. de Hyflo, mediante la introducción y agitación de 800 cm³ de alcohol abs, otra fracción de polisacaruro. Esta se filtra a través de un filtro en vacío de cristal G3 quedando un filtrado claro, amarillo que practicamente no contiene ningún polisacaruro más. El residuo Hyflo se agita como en las precipitaciones arriba descritos tres veces, cada una con 100 cm³ de agua destilada, se filtra a través de un filtro de vacío de cristal y se lava con agua. Mediante liofilización se obtiene del extracto acuoso un polvo coposo incoloro. La siguiente tabla da las proporciones de cantidad de cada una de las precipitaciones:

20.	1 ^a .	Precipitación:	concentración	alcohólica	65%	residuo	3g
	2 ^a	"	"	"	75%	"	2,9g
	3 ^a	"	"	"	80%	"	3,9g

Solución restante no precipitable (Partes de baja molecularidad) 4,5 g.

25. Los precipitados obtenidos se disuelven por separado y nuevamente se precipitan después de las tres concentraciones alcohólicas 65%, 75% y 80%. Entonces se reúnen los tres precipitados de 65% de contenido alcohólico, todas las de 75% y todas las de 80%.
30. Si esta precipitación fraccionada y reunion selectiva



317

de todas las fracciones de igual clase se efectúa una tercera vez, entonces se obtienen preparados de polisacaruros que están diferenciados por peso molecular cada vez menor. El precipitado a 65% de contenido alcohólico es el ácido viscúmico con sus sales metálicas en forma altamente limpia, mientras que el precipitado a 75% de contenido alcohólico además del ácido viscúmico y sus sales, aún contiene materias lastre y el precipitado a 80% es prácticamente ineficaz, es decir, no contiene ácido viscúmico.

5.

10.

Ejemplo - 6.

4 kg. de bayas de muérdago se exprimen en una prensa hidráulica a una presión de 100 tns, y la torta de prensado se lava ulteriormente con poca agua destilada. Se obtienen así unos 4 litros de jugo de prensado. Este se dializa como descrito en el ejemplo 1 en mangas de celofan contra agua destilada y la parte no dializable se elabora como en el ejemplo 1 al ácido viscúmico enriquecido.

15.

20.

Ejemplo - 7.

49 g. de corazones de bayas de muérdago se extraen como descrito en el ejemplo 3, obteniéndose 10 g. de extracto seco (Liofilizado). De éste se disuelven 4 g. en 70 cm³ de agua y en una manga de celofan se dializa exhaustivamente contra agua destilada. De la parte no dializable se obtienen por liofilización 0,85 g. del preparado 20 101 B₂ como producto coposo, incoloro, que representa una mezcla enriquecida de ácido viscúmico y sales del

25.

30.



mismo.

Esta mezcla se puede elaborar a ácido vis-
cúmico altamente purificado como sigue:

- Una solución de 240 mg. de la substancia
en 50 cm³ de tope de borato ácido clorhídrico del pH
8,51 (según Soerensen) se someten, en un sistema
de aparatos según Tiselius, a una tensión de 260 V
(intensidad 52 mA) y a una temperatura de 3,5 hasta
5^oC durante 6½ horas a la electroforesis. Aquí se
alimenta solo el brazo en el lado anódico con la
substancia. Se pueden diferenciar los siguientes tres
componentes distintos: 1^o, uno de traslación rápida
anódica, 2^o, uno de traslación lenta anódica y 3^o,
una que no se mueve del lugar de origen. Mediante
una toma de unas dos horas se pueden aislar las frac-
ciones correspondientes. El ácido viscúmico se encuen-
tra en la fracción parada, mientras que las otras
dos fracciones son ineficaces. Mediante diálisis con-
tra agua destilada y liofilización se obtiene el
ácido viscúmico.
- Ejemplo - 8.
- 1,35 g. del preparado 22 303 D, obtenido
según el ejemplo 1, disuelto en 40 cm³ de tope de
borato-ácido clorhídrico del pH 8,51 (seg. Soerensen)
se liberan en una centrífuga rápida de las partículas
suspendidas y ingrediente de densidad, preparado mez-
clando tope de borato-ácido clorhídrico (pH 8,51)
con solución de azúcar de caña concentrada, se somete
a la electroforesis. Aquí se encuentra el cátodo
arriba y el anodo abajo en la columna. En la luz
ultravioleta se pueden distinguir 4 zonas ligera-

270317



mente fluorescente. Terminada la operación, éstas se extraen individualmente de la columna y mediante dialisis exhaustiva contra agua destilada en mangas de celofan se liberan de las mezclas de baja molecularidad. La parte no dializable se transforma cada vez por liofilización en un polvo seco. Se pueden separar las siguientes fracciones.

Zona	Comportamiento en el campo electrico	Efecto represor de tumores
1	Traslación muy rápida anódica	inactivo
2	Traslación rápida anódica	fuertemente activo
3	Traslación lenta anódica	fuertemente activo
4	Parada	poco material

Ejemplo - 9.

Una solución de 5 g. del preparado 26 327, obtenido según el ejemplo 4, disuelta en 20 cm³ de agua, se deja pasar sucesivamente a través de un intercambiador de iones básico (Dowex 1 x 8, forma OH: 20 ml) y un intercambiador de iones ácido

(Dowex 50 x 8, forma H: 20 ml) lavándose cada vez ulteriormente con aproximadamente, 75 cm³ de agua destilada. La solución polisacarurica, liberada de este forma de los iones inorgánicos, se dializa a

continuación en un dializador de cámara de agitación continuamente contra 60 litros de agua destilada durante 70 horas y finalmente se libera en la centrifuga Ultra (Rev. 12590/min. durante 35 minutos de una pequeña cantidad de las particulas en suspenso.)



De la solución clara se obtiene por liofilización un preparado coposo, brillante como la seda, del ácido viscúmico libre. Preparado nº 28 316.

5. El ácido viscúmico libre muestra el mismo efecto represor de tumores como la mezcla del ácido y sus sales. Analíticamente se puede sin embargo caracterizar mejor. Posee las propiedades físicas indicadas al principio.

Ejemplo - 10.

10. En un dializador de cámara de agitación con membranas de celofan ("Cuprofan" y "Cellpack") se dializa continuamente una solución de 1g del preparado 26 327 en 20 cm³ de agua, primeramente contra 20 litros de ácido clorhídrico 0,01-n, después contra 20 litros de agua destilada (hasta que no se puedan demostrar mas iones de Na y Cl). Entonces se retira la parte no dializable y se liofiliza. Se obtiene un preparado incoloro del ácido viscúmico, brillante como la seda (Preparado 28 316).

20. Ejemplo - 11.

25. 50 mg. de ácido viscúmico (Preparado 28 316) se disuelve en 1 cm³ de ácido fórmico al 85%, se funde en un tubo de cristal y durante 2 horas se calienta a 110°. Después se evapora el ácido fórmico en vacío y las últimas huellas se retiran evaporando varias veces con alcohol abs. A continuación se cromatografía el hidrolizado en papel. Sistemas: n-propanol/acetato etílico/agua 7:1:2 y acetato etílico/piridina/agua 2:1:2. Se pueden comprobar principalmente galactosa y arabinosa, además, también poca
- 30.



0317

ramosa y un ácido urónico, posiblemente ácido glucurónico.

Ejemplo - 12.

- 50 mg. de ácido viscúmico (Preparado 28 316)
5. se disuelven en 3 cm³ de ácido sulfúrico n, se funden en el tubo de cristal y durante 4 horas se calienta a 110°. Después de enfriar se filtra de algunos copos sin disolver y el filtrado se neutraliza con 7 cm³ de solución de hidróxido de bario saturada (aproximadamente 0,2-0,3-n) hasta el punto de transición al rojo congo y a continuación se pone, mediante la adición de una punta de espátula de carbonato de bario, a un pH de aproximadamente 7. La precipitación de sulfato de bario se filtra a través de una capa delgada de Hyflo supercel, el residuo del filtrado se
10. hierve con 20 cm³ de agua y el extracto acuoso se reúne con el primer filtrado y en vacío se evapora hasta secar. El cromatograma de papel se efectúa en los sistemas descritos en el ejemplo 11. Como componentes principales del ácido viscúmico se identifican:
15. Galactosa, arabinosa, ramosa y posiblemente un ácido aldobiurónico.
- 20.

Ejemplo - 13.

- 200 mg. de ácido viscúmico (Preparado 28316)
25. se disuelven en 10 cm³ de ácido clorhídrico al 12% y a una temperatura del baño de aceite de 140-150° se hierve al reflujo durante 5 horas en corriente de nitrógeno. El ácido carbónico liberado se recoge en solución de hidróxido de bario y el carbonato de bario precipitado se seca bien y se pesa. Se obtienen 27 mg
- 30.



décarbonato de bario, lo que corresponde a aproximadamente 6 mg. de dióxido de carbono y da un peso equivalente de aproximadamente 1500 con respecto a 1 mol. de ácido urónico.

5. Ejemplo - 14.

50 mg. de ácido viscúmico (Preparado 28316) se disuelven en 3 cm³ de agua destilada, se funden en un tubo de cristal y durante 4 horas se calienta a 110°. Después de enfriar se filtra de algunos copos sin disolver y el hidrolizado se evapora en vacío hasta secar. El cromatograma de papel da el siguiente cuadro: De la molécula del ácido viscúmico se disocia principalmente solo arabinosa. Además se encuentra una mancha ligera que puede ser debida a la 2-desoxi-galactosa.

10.

15.

Ejemplo - 15.

50 mg. de ácido viscúmico (Preparado 28 316) se disuelven en 3 cm³ de ácido sulfúrico n y en el recipiente cerrado se deja reposar en la oscuridad durante una semana a temperatura de ambiente. El ácido sulfúrico se retira entonces con hidróxido de bario y carbonato de bario como descrito en el ejemplo 12 y en el cromatograma de papel del hidrolizado del ácido viscúmico se obtienen los mismos cuadros en la hidrólisis de agua caliente descrita en el ejemplo 14.

20.

25.

Ejemplo - 16.

12,7 g. del preparado 22 303 D (vease ejemplo 1) se disuelven agitando durante 4 horas en 150 cm³ de agua. Después se separan por centrifugación las partículas en suspensión aún existentes. En la solución

30.



270317

- acuosa, que abarca los 150 cm³, se gotean, agitando bien y enfriando en el baño de hielo, 300 cm³ de acetona, siguiéndose con la agitación a 0° después de agregar 10 g. de Hyflo. El precipitado se separa con facilidad a través de un filtro de vacío de cristal. Se lava ulteriormente con acetona acuosa al 70%. Después se disuelve el material de alta molecularidad mediante repetida extracción del residuo de Hyflo con agua destilada y por liofilización de la solución clara se obtienen 6,0 g. de un preparado limpiado del ácido viscúmico en mezcla con sus sales metálicas.
- 5.
- 10.

Ejemplo - 17.

- 2 g. del preparado 22300 A, un producto en bruto correspondiente al preparado 22303 D, que ha sido limpiado adicionalmente por filtración de clarificación mediante Hyflo, se disuelve en 40 cm³ de agua. Después se gotean, agitando y enfriando con hielo 5 cm³ de una solución al 20% de cloruro β-fenoxietilodimetilo-dodecilamónico. Después de reposar varios días a temperatura bajo (0°) se precipita el enturbiamiento fuerte, al principio en forma coposa, que se puede separar por filtración.
- 15.
- 20.

El filtrado se somete a diálisis contra agua destilada en una manga de celofan. El contenido de la manga se liofiliza y se obtienen 1,15 g. de un producto incoloro, coposo, que representa el ácido viscúmico en mezcla con sus sales.

25.

Ejemplo - 18.

- 2,0 g. del preparado 26 327 se disuelven agitando en agua destilada y el volumen se completa
- 30.

0317



- a 2 litros. La solución se filtra en forma esteril a través de un filtro de membrana (Membranfilterges. Goettingen Nº 6) Cada 2,5 cm³ de esta solución se llenan en redomas de 10 cm³ de capacidad, bajo condiciones asépticas se congela a -40^o, a una temperatura final de + 20^o se liofiliza e inmediatamente se cierra.
5. Aquí hay que observar que el preparado no se exponga a ninguna irradiación fuerte de ultravioleta mientras se encuentre en solución acuosa. En estado seco es
10. menos sensible a la luz ultravioleta.

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 cuano no alteren su principio fundamental.
15. También se hace constar que el invento se refiere a dos solicitudes de patentes presentadas en Suiza con fechas 9 de septiembre y 6 de julio de 1961^{y 1960} nos. respectivamente 10219/60 y 7938/61, acogiendose por lo tanto
20. a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita patente de invención por 20 años en España; " PROCEDIMIENTO PARA
25. LA OBTENCION DE UN POLISACARURO NUEVO "; caracterizándose por lo siguiente:

- 1^a.- Procedimiento para la obtención de un polisacaruro nuevo, caracterizado, porque el ácido viscúmico, sus sales o mezclas de las mismas se aíslan
30. en forma limpiada del material vegetal Viscum album o



270314

clases de Loranthus.

- 5, 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el material vegetal de *Viscum album* o clases del *Loranthus* se extrae con agua o se prensa y a continuación el extracto o el jugo de prensado se somete a una diálisis y de la parte del extracto no dializable se aísla el ácido viscúminico, o sus sales.
10. 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque como material de partida se emplea *Loranthus europeus* L.
15. 4ª.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1-3 caracterizado porque el ácido viscúmico, o sus sales, se aísla por precipitación fraccionada mediante disolventes orgánicos miscibles con agua.
20. 5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque el ácido viscúmico, o sus sales, se aísla mediante electrofóresis.
30. 6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque el ácido viscúmico, o sus sales, se limpian y aíslan mediante precipitación de las materias lastre con compuestos amónicos cuaternarios.
- 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 4ª, caracterizado porque como material de precipitación se emplea etanol.
- 8ª.- Procedimiento según la reivindicación 6ª, caracterizado porque como material de precipitación se emplea cloruro β -fenoxietilo-dimetilo-dodecilamónico.
- 9ª.- Procedimiento según la reivindicación 7ª,



caracterizado, porque para la precipitación se crea una concentración de 55-75% de etanol.

5.

10ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque en cualquier etapa del procedimiento se desinfectan con formaldehído los extractos obtenidos que contienen ácido viscúmico.

10.

11ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque los mencionados métodos de aislamiento se combinan entre si o se efectúan repetidas veces, en caso dado con una ulterior diálisis.

12ª.-" Procedimiento para la obtención de un polisacaruro nuevo"; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

15.

Esta memoria consta de veinticinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid.

CIBA SOCIETE ANONYME.