



273472

# MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años en España, por "PROCEDIMIENTO DE

FRACCIONAMIENTO DE ACIDOS CONJUGADOS DE BILIS"

a favor de

ARMOUR PHARMACEUTICAL COMPANY

domiciliado en Prudential Plaza, Chicago, Illinois.

INVENTOR: Harold James Antonides.

273472



5 Mi invención se relaciona con la separación de ácidos biliares conjugados y con el ácido taurocólico que está esencialmente exento de ácido glicocólico.

5 La secreción hepática conocida por bilis contiene ácido glicocólico y ácido taurocólico conjugados. En estos compuestos el ácido cólico está combinado, o conjugado, con los aminoácidos taurina o glicina. El extracto de bilis de buey, preparado de la bilis de vejiga fresca mediante extracción con disolvente de bilis concentrada, es alcalino en su pH y consta esencialmente de una mezcla de clicocolato sódico y taurocolato sódico con cantidades menores de otros ácidos biliares conjugados. Al descender el pH de estas sales por debajo de un valor neutro, se tornan ácidos.

10 Los métodos ordinarios de preparación de ácidos biliares purificados implican la saponificación o hidrólisis de los productos naturales conjugados para formar ácidos biliares libres o sin conjugar, especialmente el ácido cólico. Hasta ahora, el ácido taurocólico y el ácido glicocólico han sido extremadamente difíciles de obtener de fuentes naturales. Formas comúnmente usadas de ácidos biliares conjugados son los extractos consistentes en mezclas de varios de dichos ácidos en varias fases de descomposición.

15 Es bien sabido que los productos crudos biliares y los extractos de la bilis que contienen ácidos glicocólicos y taurocólicos producen náuseas y vómitos cuando se administran en una forma activadora del estómago. Por esta razón, los productos biliares usados para fines medicinales se suministran o bien como complejos insolubles que no funcionan como emulsionadores en el estómago, o como dosis revestidas de productos entéricos que no llegan a ser influidas por el estómago. Yo he descubierto que los efectos irritantes de la bilis se deben principalmente al ácido glicocólico; el ácido taurocólico exento de ácido glicocólico no es irritante.

273472



5 Además, a una acidez normal del estómago de un pH aproximado de 1,5 a 3,0, el ácido aturocólico es soluble y actúa de auxiliar surfac- tante en la preparación de alimentos para su absorción y digestión, mientras que el ácido glicocólico se torna insoluble a los valores normales de pH del estómago. Anteriormente no ha existido ningún producto de ácido biliar conjugado de fácil preparación disponible, que actua en el estómago como agente emulsionador y solubilizador.

10 En consecuencia, he descubierto que el empleo de un aspecto de mi invención, que proporciona un método sencillo de se- paración de ácido glicocólico del ácido taurocólico, puede ofrecer preparados biliares bien tolerados que son fisiológicamente activos a unos valores bajos de pH, tal como los que se encuentran en el estómago.

15 El objeto principal de esta invención es el de propor- cionar un sencillo método para separar los ácidos conjugados de la bilis cruda. Otro objeto es el de proporcionar un método que permita una efectiva actividad de la bilis en el estómago. Otros objetos y ventajas resultarán evidentes a medida que avance la descripción.

20 Un aspecto de esta invención se basa en el descubrimien- to de que los ácidos biliares conjugados con taurina no resultan in- solubles sino que permanecen en solución cuando se asidifican en pre- sencia de cationes trivalentes.

25 En una versión de separación preferida de esta invención, pueden emplearse tres operaciones básicas. La primera operación con- siste en un proceso de purificación para separar proteína, grasa, colesterol y pigmentos extraños de la bilis mediante el uso de sulfá- to de zinc. La siguiente operación se refiere a la precipitación del conjugado de glicina mediante iones metálicos trivalentes. Una terce- ra operación implica la purificación final y secado de las fracciones  
30 biliares solubles que contienen los conjugados de taurina.

273472



5 Como queda indicado, un producto biliar crudo, preferible  
mente bilis de buey, se purifica mediante el uso de sulfato de zinc.  
Este procedimiento de purificación es bien conocido en el arte ante-  
rior. La bilis cruda se ajusta aproximadamente a un pH de 10 a 12  
15 con hidroxido sódico. Luego puede añadirse una solución de sulfato  
de zinc y agitarse la mezcla. Se agrega un equivalente molecular de  
sulfato de zinc, que reacciona con el hidróxido sódico para produ-  
cir hidróxido de zinc. El pH de la resultante mezcla puede ajustar-  
se aproximadamente a 7,5 usando un ácido mineral tal como el clorhi-  
20 drico o sulfúrico. Luego se separa la mezcla, preferiblemente por  
filtración, y se retiene el filtrado. Después de esta separación,  
que retira las impurezas precipitadas y adsorbidas, se añade una  
solución de una sal que contenga un ion metálico trivalente al fil-  
trado y se ajusta el pH en 4,0 aproximadamente; como ejemplos de sa-  
15 les utilizables en esta segunda operación puede citarse el cloruro  
de aluminio, nitrato de aluminio, acetato de aluminio, cloruro fé-  
rrico, nitrato férrico, cloruro crómico, etc. Se ha descubierto que  
los iones metálicos divalentes tales como ferrosos, cálcicos, man-  
ganesicos, magnésicos, etc., no poseen las deseables propiedades  
20 precipitantes de los iones trivalentes. Sólo los iones metálicos tri-  
valentes forman un complejo de los ácidos conjugados con la glicana,  
que son luego precipitados en forma de complejos insolubles en agua.  
Durante esta operación de fraccionamiento, puede emplearse un pH  
de 3,7 a 5,5 aproximadamente. Se aplica un ligero exceso de iones  
25 metálicos trivalentes preferiblemente en la mezcla para asegurar  
la retirada de los conjugados que no sean la turina. Luego se sepa-  
ra la mezcla por filtración o por centrifugación y se retiene el  
filtrado.

30 El precipitado consta principalmente de ácido glicocó-  
lico, formando complejo con metales. El ácido glicocólico purifica-



273472

do puede prepararse a partir del precipitado elevando el pH del complejo, por ejemplo, con hidróxido sódico, separando aquel y produciendo así glicocólico soluble.

5 La elaboración del filtrado durante la tercera operación implica una ulterior purificación del mismo. Este filtrado contiene ácido taurocólico y sales solubles en agua, tales como cloruro y sulfato sódicos. Preferiblemente, el filtrado se concentra mediante destilación al vacío o procedimiento comparable, y se seca. Aunque pueden emplearse otros métodos de secado, la concentración al vacío hasta un 50% aproximadamente de sólidos seguido de secado por pulverización o secado en recipiente, se prefiere por razones económicas. Después de secar, se mezcla el filtrado con alcohol, preferiblemente metanol al 99%. Yo prefiero usar alcoholes solubles en agua, pero pueden también emplearse muchos otros disolventes orgánicos, satisfactoriamente. Seguidamente puede filtrarse y secarse la mezcla. Si se desea, puede efectuarse en este momento una decoloración con carbón. Preferiblemente, el filtrado alcohólico es concentrado al vacío y secado en un recipiente, si bien pueden emplearse otros medios de secado satisfactoriamente.

20 El filtrado seco y purificado consiste esencialmente en ácido taurocólico, que tiene la formula empírica  $C_{26}H_{45}NO_7S$  y un peso molecular de 515,69. Es un polvo color ante dotado de un olor y sabor suaves característicos, libremente soluble en agua en una amplia variedad de valores de pH, y soluble en alcoholes y soluciones hidroalcohólicas.

25 Se supone que los ácidos biliares conjugados de producción natural proporcionan la forma más deseable de actividad biliar para la mejora de ciertos procesos metabólicos. Las formas libres o conjugadas de ácido biliar se encuentran en el organismo sólo en condiciones patológicas, especialmente del hígado. La bilis normal

30



273472

contiene esencialmente formas completamente conjugados de los ácidos biliares.

5

Los ácidos biliares conjugados se consideran esenciales en la digestión y metabolismo de grasas al actuar como emulsionadores y activadores del sistema de enzimas de la lipasa. El ácido taurocólico exento de glicocólico puede añadirse a los productos nutritivos triglicéridos adecuados para administración oral, facilitando así su digestión. El ácido taurocólico puede combinarse con enzimas digestivas para producir los necesarios componentes para la digestión de alimentos en múltiples estados de funcionamiento digestivo.

10

Los ácidos conjugados desempeñan también importantes papeles en la absorción de vitaminas solubles en aceites, tales como las A, D, E y K, de la vía intestinal. Además, desempeñan posiblemente un papel en la solubilización del colesterol de los fluidos corporales. Sólo el ácido taurocólico es activo en el estómago, como un agente emulsionador y solubilizador bien tolerado.

15

El siguiente ejemplo específico servirá para ilustrar mejor la invención.

20

Se colocaron en un depósito forrado de vidrio 7.200 libras (3.266 k) de bilis de buey tratada con cáustico hasta un pH de 11 aproximadamente. Se añadieron a la bilis alcalina 21 galones (78 l.) de una solución de sulfato de zinc al 40%, conteniendo 71,5 libras (32,4 k) de sulfato de zinc.

25

Se agregó suficiente ácido sulfúrico para producir un pH de 7,5 aproximadamente. Después de agitar durante 30 minutos, se reajustó la acidez a un valor comprendido entre 7,5 y 7,6 con adicional ácido sulfúrico. Con agitación continuada, se añadieron a la bilis 143 libras (64,8 k) de ayuda filtrante (Celite 535). La bilis tratada fue luego filtrada a través de una prensa de caja usando lona de 8 onzas (226 g.). Después de completarse el filtrado se

30



273472

rompió la prensa, se retiró la masa, se lavó con agua la lona y se retuvo aquella.

5 Después de reajustarse el filtrado a un pH de 7,5 aproximadamente con ácido sulfúrico, se añadió suficiente solución de cloruro férrico al 20% para ajustar el pH a 5,0. Después de 15 minutos de agitación, se agregó solución adicional de cloruro férrico hasta alcanzar un pH de 3,8. La adición del cloruro férrico causó precipitación dentro del filtrado. Esta mezcla fue filtrada a través de la prensa reacomplada, lavándose minuciosamente la masa con agua y reteniéndose para su secado.

10 El filtrado fue secado mediante espesamiento y se extrajo con alcohol, A 11 libras (5 k) del filtrado seco se añadieron 7,5 litros de metanol, 0,4 libra de carbón activado y 0,8 libra (363 g.) de ayuda filtrante. Después de calentar y mezclar para

15 disolver el ácido taurocólico en el metanol, se filtró la mezcla. El filtrado seco fue extractado tres veces con 3 litros aproximadamente de metanol, que se usó para la segunda y tercera extracciones.

20 El filtrado extractado con metanol fue concentrado en un alambique de funcionamiento al vacío y el metanol retirado para su ulterior uso. El concentrado de ácido taurocólico y metanol fue secado luego al vacío. La identidad y composición del ácido taurocólico secado fueron confirmadas por métodos elementales, cromatográficos y espectrofotométricos.

25 La precedente descripción detallada se ha ofrecido sólo para una mayor claridad de comprensión. Por consiguiente, no deberán entenderse limitaciones algunas de la misma, pues como resultará evidente a los expertos en el arte, esta invención es susceptible de admitir otras versiones y muchos de los detalles pueden variarse sin apartarse del concepto básico y espíritu de la invención.

273472



REIVINDICACIONES

En resumen: la Patente de Invención cuyo registro se solicita recederá sobre las reivindicaciones siguientes:

5 1. Procedimiento de fraccionamiento de ácidos conjugados de bilis, que incluye las operaciones de acidificación de material biliar, adición de cationes trivalentes en cantidades suficientes para hacer insolubles los ácidos biliares conjugados con glicina, y separación de los ácidos biliares insolubilizados.

10 2. Procedimiento de fraccionamiento de ácidos biliares conjugados, que incluyen las operaciones de acidificación de materiales biliares son hidrolizar, a un pH aproximado de 3,7 a 5,5, la adición de cationes trivalentes en cantidades suficientes para hacer insolubles a los ácidos biliares conjugados con glicina, y la separación de los ácidos insolubilizados.

15 3. Procedimiento de fraccionamiento de ácidos biliares conjugados, que comprende las operaciones de acidificación de material biliar a un pH de 3,7 a 5,5, la adición de iones aluminicos para formar un complejo insoluble de los ácidos biliares conjugados con glicina, y recogida del resultante complejo.

20 4. Procedimiento de fraccionamiento de ácidos biliares, que comprende las operaciones de acidificación de material biliar crudo a un pH aproximado de 3,7 a 5,5, la adición de iones férricos para hacer insoluble a los ácidos conjugados con glicina, y la separación de los ácidos insolubles.

25 5. Procedimiento de fraccionamiento de ácidos conjugados biliares, que incluye las operaciones de acificación de material biliar crudo a un pH aproximado de 3,7 a 5,5, la adición de cationes trivalentes en cantidades suficientes para formar un complejo insoluble de los ácidos biliares conjugados con glicina, el filtrado del material biliar para formar un filtrado, el secado de dicho filtrado.

30



ENE 1952

273472

el mezclado con el filtrado seco con alcohol, el filtrado de la mezcla alcohólica y el secado del filtrado alcohólico.

5 6. Procedimiento de fraccionamiento de ácidos biliares conjugados, que incluye las operaciones de ajuste del pH de la bilis cruda a un valor de 10 a 12, la adición de solución de sulfato de zinc, el ajuste de la bilis a un pH aproximado de 7,5, el filtrado de la bilis para preparar un filtrado, la recogida de éste, la adición de cationes trivalentes al mismo en cantidades suficientes para formar un complejo insoluble de los ácidos biliares conjugados con glicina, el nuevo filtrado de la bilis para formar un segundo filtra-  
10 do, y la recogida del segundo filtrado.

15 7. Procedimiento de preparación de un producto biliar que consta esencialmente de ácidos taurocólicos, que comprende las operaciones de ajuste del pH del material biliar crudo a un valor de 10 a 12, y la adición de solución de sulfato de zinc y reducción del pH de la mezcla a 7,5 aproximadamente, con un ácido mineral, para purificar así al material, el filtrado del material purificado para formar un filtrado, la retención de dicho filtrado, la adición de iones férricos al filtrado y el ajuste de la acidez a un pH de 3,7  
20 a 5,5 aproximadamente para producir la precipitación de los conjugados glicocolatos, la separación de los conjugados del filtrado, la evaporación de dicho filtrado hasta su secamiento, la mezcla del filtrado seco con un alcohol soluble en agua, el filtrado de la mezcla alcohólica y el secado del filtrado alcohólico.

25 8. Procedimiento para establecer una actividad biliar efectiva en el estómago, que comprende las operaciones de formar un preparado de ácido taurocólico esencialmente libre de ácido glicocólico y administrar el ácido taurocólico en una forma que sea fisiológicamente activa en el estómago.

30 9. Se reivindica por último, como objeto sobre el que

273472



5 ENE 1962

ha de recaer la Patente de Invención cuyo registro se solicita:

"PROCEDIMIENTO DE FRACCIONAMIENTO DE ACIDOS CONJUGADOS DE BILIS".

Tedo conforme queda descrito en la presente Memoria, que consta de diez páginas mecanografiadas.

Madrid, 5 de enero de 1962

ALFONSO UNGRIA

P.P. *[Handwritten signature]*