

22 JUL 1963

P.- 24.734

Nº 746 E



290 193

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

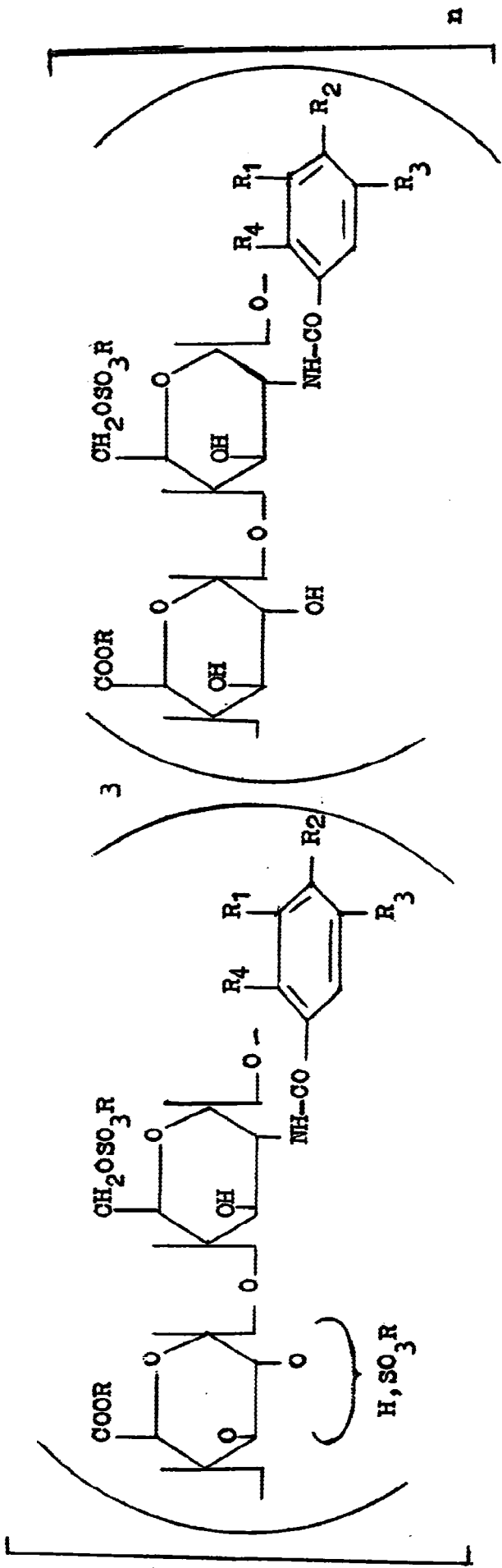
por VEINTE años

a nombre de ROUSSEL-UCLAF, sociedad anónima francesa, establecida en 35, Boulevard des Invalides, París, Francia, por:

"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE N-(SULFOBENZOIL) N-DESULFO HEPARINAS"

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de nuevos compuestos, las N-(sulfo benzoil) N-desulfo heparinas y sus sales de metales alcalinos, las cuales son utilizables especialmente para el tratamiento de las enfermedades de la coagulabilidad sanguínea. Las N-(sulfo benzoil) N-desulfo-heparinas responden a la fórmula general:

22



29 01 93



en la cual R representa hidrógeno o un átomo de metal alcalino. R₁, R₂, R₃ y R₄ representan simultáneamente o distintamente, un átomo de hidrógeno o un grupo sulfónico libre o salificado, estando excluido el que R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = hidrógeno.

Se conocen ya los derivados N-acilados de la N-desulfo heparina tales como N-benzoil N-desulfo heparina, N-p-nitro benzoil N-desulfo heparina, N-3,5-dimetilbenzoil N-desulfo heparina, etc. descritos en la patente española número 250.529, que poseen una actividad anticoagulante mínima.

Por otra parte, se sabe igualmente que la transformación de la N-desulfo heparina en urea sustituida, conduce como se ha descrito en la patente española número 258.108, a compuestos tales como la n-butil heparilurea, fenil heparilurea o alfa-naftil heparilurea, dotados de una actividad anticoagulante poco pronunciada.

Ahora se ha descubierto que las N-(sulfobenzoil) N-desulfo heparinas y sus sales alcalinas obtenidas según el procedimiento objeto de la invención, poseen una clara actividad anticoagulante y, más especialmente, una acción anticoagulante prolongada, que puede manifestarse durante 6 a 10 horas después del momento de administración.

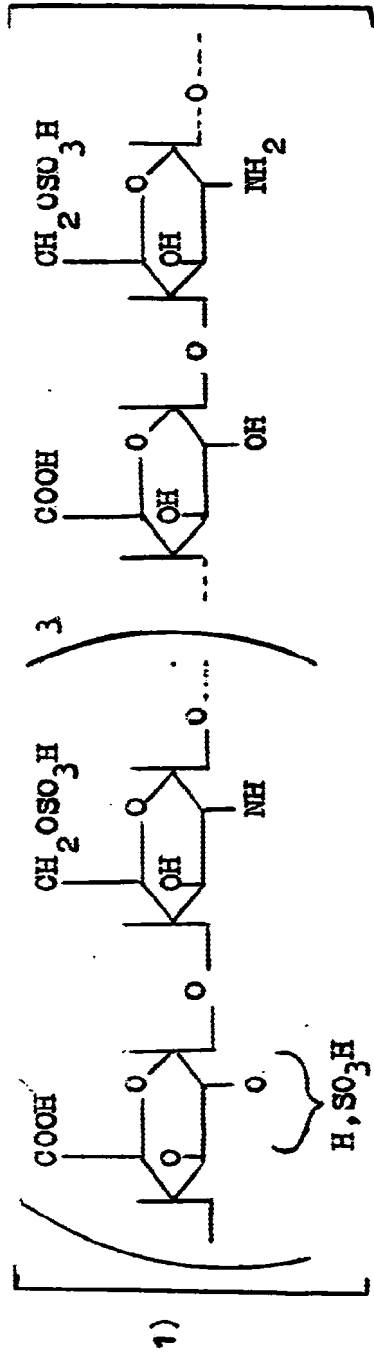
El procedimiento de preparación de estos compuestos se caracteriza esencialmente por que se transforma la N-desulfheparina en una sal de amonio cuaternario de larga cadena de carbonos, se hace reaccionar sobre esta sal de amonio cuaternario, el anhídrido o un anhídrido mixto de un ácido benzoico mono- o polisulfonado, y se transforma finalmente, llegado el caso, la amida resultante en la

29 01 93



sal de un metal alcalino, por acción de un acilato inferior de metal alcalino.

El esquema siguiente resume las reacciones:



+ sal de amonio cuaternario de cadena larga



sal de amonio cuaternario de la N-desulfo heparina

2) Sal de amonio cuaternario de la N-desulfo heparina

+ anhídrido de ácido benzoi- co sulfonado

emina $\xrightarrow{\text{terciaria}}$

N(sulfobenzoil)
N-desulfo-heparina

3) N-(sulfobenzoil)

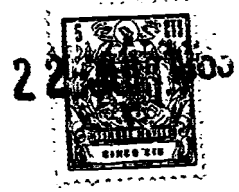
scilato inferior



N-desulfo heparina
alcalino

N-(sulfobenzoil)
N-desulfo heparina, sal de metal alcalino

290133





En sus modos de ejecución, el procedimiento de preparación de las N-(sulfobenzoil) N-desulfo heparinas, puede caracterizarse por los puntos siguientes:

- 5 - Las sales de amonio cuaternarias que convienen especialmente para la preparación de las sales de amonio cuaternarias de la N-desulfo heparina, son de preferencia la hiamina 2.389, que es el cloruro de trimetil (metilododecibenzil)amonio, Arquad 20 o cloruro de dilauril dimetilamonio y, especialmente, la hiamina 1622 o cloruro de benzildimetil 2 [2-(p-1,1,3,3-tetrametil butilfenoxi)-etoxi] etilamonio;
- 10 - El anhídrido o anhídrido mixto de un ácido benzoico mono- o polisulfonado, que se hace reaccionar sobre la sal de amonio cuaternaria de la N-desulfo heparina, es preferentemente
15 te anhídrido o-sulfobenzoico, anhídrido del ácido 2,4-disulfobenzoico, anhídrido mixto del ácido 3,5-disulfobenzoico y del ácido etoxi-carbónico, o anhídrido mixto del ácido m-sulfobenzoico y del ácido etoxi-carbónico;
- 20 - el acilato inferior de un metal alcalino que se emplea para la obtención de sales alcalinas de N-(sulfobenzoil) N-desulfo heparinas es de preferencia el acetato sódico.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, pero sin limitarla.

25 Ejemplo I - Preparación de la sal de sodio de la N-(2-sulfobenzoil) N-desulfo heparina

Se introducen 9,07 g de N-desulfo heparina en 50 cm³ de agua, se añaden después 250 cm³ de una solución acuosa al 10 % de hiamina 1622, se homogeneiza el precipitado formado, se deja en reposo durante aproximadamente
30 una hora, se filtra con succión y se lava con agua. Se ob



tienen 28,5 g de sal de hiamina de N-desulfo heparina,
que se emplean tal cual para la etapa siguiente de la sín-
tesis. Se introducen agitando, 3 g de compuesto arriba in-
dicado en 60 cm³ de tetrahidrofurano, y se agita hasta di-
5 solución. Después, se añaden sucesivamente y bajo agita-
ción, 3 cm³ de trietilamina y 1,5 g de anhídrido o-sulfo-
benzoico. Se continúa la agitación durante 15 horas a la
temperatura ambiente. Se evapora seguidamente hasta seque-
dad bajo vacío, se recoge el residuo en 30 cm³ de N-buta-
10 nol acuoso, se extrae la solución n-butanólica en varias
veces con una solución de acetato sódico al 20%, se fil-
tran los extractos reunidos, se vierte el filtrado en me-
tanol, se deja en reposo durante aproximadamente una hora,
se filtra con succión el precipitado formado, se lava con
15 metanol y se seca. Se obtienen 1,047 g de sal de sodio de
la N-(2-sulfobenzoil) N-desulfoheparina.

Espectro U.S. : (ácido clorhídrico N/10) absorción a 266
y 272 m/ μ correspondiente a $1,3 - 1,4 \cdot 10^{-3}$ moles de ácido
o-sulfobenzóico por gramo.

20 Este producto es soluble en agua, insoluble en al-
cohol, éter, acetona, benceno y cloroformo. Los ácidos di-
luídos acuosos lo hidrolizan. Los álcalis diluídos acuo-
sos lo degradan.

Análisis: $(C_{76}H_{77}O_{77}N_4S_{11}Na_{15})_n = (2.976,12)_n$
25 Calculador: % 11,85
Encontrado: 11,4

Este compuesto no está descrito en la bibliografía.
Actividad anticoagulante: $36,5 \pm 1,5$ UAT/mg.

30 Ejemplo II: Preparación de la sal de sodio de la
N-(2,4-disulfobenzoil) N-desulfo hepa-
rina

29 01 93



Se disuelven 17,88 g de sal de potasio de N-desulfoheparina en 100 cm³ de agua, se añaden después 500 cm³ de una solución acuosa de hiamina 1622 al 10%, se homogeneiza la mezcla de reacción, se deja en reposo durante una a dos horas aproximadamente, se filtra con succión el precipitado, se lava con agua y se seca bajo vacío. Se obtienen 56 g de sal de hiamina de N-desulfo heparina (A).

Por otra parte, se prepara la sal de hiamina del anhídrido de ácido 2,4-disulfobenzóico (B): se disuelven 70 g de sal de sodio del ácido 2,4-disulfobenzóico en 700 cm³ de agua y 70 cm³ de ácido fórmico. Después, se añaden 1550 cm³ de una solución acuosa de hiamina al 10%, se extrae en varias veces con cloruro de metileno, se reúnen los extractos, se evaporan, se expulsa el agua por arrastre con benceno, se recoge el residuo seco con 70 cm³ de tricloroetileno, se lleva a reflujo hasta disolución, se deja enfriar hacia 50-60°C, y se introducen agitando 105 cm³ de cloruro de tionilo. Se continúa la agitación durante 2 horas aproximadamente, a una temperatura situada entre 75 y 80°C, se destila al principio bajo presión normal y, después bajo vacío, hasta que no quedan más que trazas de cloruro de tionilo. Se recoge seguidamente el residuo en 700 cm³ de tetrahidrofurano, se trata la solución con negro animal, se filtra y se obtiene la solución tetrahidrofuránica de la sal de hiamina del anhídrido del ácido 2,4-disulfo benzoico (B), que se emplea tal cual para la etapa siguiente de la síntesis.

Se introducen bajo agitación 49 g de sal hiamina 1622 de N-desulfo heparina (A) en 1000 cm³ de tetrahidrofurano, se añaden a continuación, después de disolución a

29 01 93



la temperatura ambiente, la solución B preparada como se ha descrito precedentemente, y se somete la mezcla de reacción a agitación durante 17 horas aproximadamente a la temperatura ambiente. Seguidamente, se evapora a sequedad bajo vacío sin sobrepasar los 50°C, se recoge el residuo en 500 cm³ de N-butanol acuoso, se extrae en varias veces con una solución acuosa de acetato sódico al 20%, se reúnen los extractos, se filtran, se añaden 750 cm³ de metanol, y se deja en reposo durante una hora a dos horas aproximadamente, se filtra después el precipitado formado, se lava sucesivamente con metanol y con éter, se seca y se obtiene la sal sódica de la N-(2,4-disulfobenzoyl) N-desulfo heparina bruta. Este producto se purifica haciendo pasar una solución acuosa del mismo sobre una resina intercambiadora de aniones fuertemente básica, tal como la que posee una estructura funcional de amonio cuaternario.

Sobre la resina se hace pasar la totalidad de la solución acuosa preparada arriba, pero no se recoge más que la fracción que da un ensayo positivo de precipitación con hiamina, se enjuaga la columna con agua destilada, se reúnen los eluatos, se tratan con negro animal, se filtran, se neutraliza el filtrado por adición de ácido acético y, después, se ajusta el pH a 7,8 con lejía de sosa, se precipita por adición de metanol, se separa el precipitado, se filtra con succión, se lava sucesivamente con metanol y con éter, se seca y se obtienen 16,7 g de sal sódica de la N-(2,4-disulfobenzoyl) N-desulfo heparina. Contenido de azufre: 12,65% (teoría: 14,18%).
Espectro U.V.: (en solución en ClH N/10)

290133



λ max. 221 m μ	E	1% 1cm	= 107
λ max. 263 m μ	E	1% 1cm	= 11,2
λ max. 270 m μ	E	1% 1cm	= 12,4
λ max. 277 m μ	E	1% 1cm	= 11,1

Actividad anticoagulante: 66,2 UAT/mg.

El producto es soluble en agua, insoluble en alcohol, éter, acetona, benceno y cloroformo.

10 Este compuesto no está descrito en la bibliografía.

Ejemplo III: Preparación de la N-(3,5-disulfobenzoyl) N-desulfo heparina (sal de sodio)

15 a) Preparación del anhídrido mixto del ácido 3,5-disulfobenzoyloico

En un matraz cónico de 500 cm³, se disuelven 3,75 g de 3,5-disulfobenzoyloato potásico, en 50 cm³ de agua destilada. El pH de la solución se ajusta a 10 por adición de potasa. Se añaden entonces 160 cm³ de una solución al 10% de hiamina 1622. La sal de hiamina del ácido 3,5-disulfobenzoyloico precipita. Se recoge por filtración y, después, se agota, en dos veces, con 100 cm³ de cloruro de metileno. La solución orgánica se lava con agua y, después, se seca sobre sulfato sódico, y se evapora a sequedad. El extracto seco se redisuelve en 30 cm³ de tetrahidrofurano. La solución se transvasa a un matraz redondo de tres tubuladuras y se enfría entre 0 y +5°C, bajo agitación y bajo atmósfera de nitrógeno. Se ajusta el pH a 10 por adición de 0,1 cm³ de trietilamina y después, se añaden 0,75 cm³

20
25
30



de cloroformiato de etilo. Se mantiene la agitación en at-
mósfera de nitrógeno. Al cabo de 15 minutos, se añaden
1,5 cm³ de una solución de formiato de trietilamina al 10%
en tetrahidrofurano, que descompone el exceso de cloroformi-
ato de etilo. Se obtiene así una solución de anhídrido
mixto del ácido 3,5-disulfobenzóico.

b) Preparación de la N-(3,5-disulfobenzóil) N-desulfo he-
parina

Se añade a la solución de anhídrido mixto prepara-
da según a), la solución siguiente:

N-desulfo heparinato de hiamina 1622	2 g
Tetrahidrofurano	30 cm ³
Trietilamina	0,5 cm ³

Seguidamente, se agita mientras se hace burbujear
nitrógeno. La solución se evapora a continuación, bajo va-
cío hasta sequedad. Se obtiene la N-(3,5-disulfobenzóil)
N-desulfo heparina, en forma de un residuo amorfo.

c) Preparación de la sal de sodio de la N-(3,5-disulfoben-
zóil) N-desulfo heparina

El residuo obtenido según b) se disuelve en 30
cm³ de butanol saturado de agua. Esta solución se agota
en tres veces, con 5 cm³ de una solución acuosa al 20% de
acetato sódico. La solución acuosa se filtra y, después,
se vierte en 100 cm³ de metanol. Precipita la sal de so-
dio de la N-(3,5-disulfobenzóil) N-desulfo heparina. Se
recoge por filtración, se filtra con succión, se lava
con metanol al 20% de agua y se seca. Se obtienen así de
0,5 a 0,55 g de sal de sodio, es decir un rendimiento de
un 55 a un 60%. El producto ha sido obtenido con un índi-
ce de amidificación que varía entre 82 y 95%.

20193



Espectro U.V.: (ácido clorhídrico N/10)

inflexiones a 270 y 230 m/μ aproximadamente.

Actividad anticoagulante: 31 ± 3 UAT/mg

5 El espectro U.V. indica la presencia de 0,97 a $1,13 \times 10^{-3}$ moles de ácido 3,5-disulfobenzóico por gramo de producto (teoría : $1,18 \times 10^{-3}$ moles/g).

Este compuesto no está descrito en la bibliografía.

10 Ejemplo IV : Preparación del N-(3-sulfobenzóil)
N-desulfo heparina (sal de sodio)

a) Preparación del m-sulfobenzóato de hiamina 1622

15 En un erlenmeyer de 300 cm³, se introducen sucesivamente 5,2 g de m-sulfobenzóato de sodio, 125 cm³ de agua destilada y 2,5 cm³ de lejía de soda. El m-sulfobenzóato de sodio se disuelve rápidamente. Se obtiene una solución alcalina de pH próximo a 10. Se añaden entonces 220 cm³ de una solución acuosa al 10% de hiamina 1622. Precipita el m-sulfobenzóato de hiamina 1622. El precipitado amorfo separado por filtración, se agota en dos veces 20 con 100 cm³ de cloruro de metileno. La solución orgánica se lava con agua, se seca sobre sulfato de sodio y se evapora a sequedad a la presión atmosférica. El residuo seco de sal de hiamina 1622 se redisuelve en 50 cm³ aproximadamente de tetrahidrofurano. Después de una disolución completa, se lleva a un volumen exacto de 100 cm³ con tetra- 25 hidrofurano.

b) Preparación del anhídrido mixto

30 En un matraz redondo de tres tubuladuras, se introducen 50 cm³ de la solución tetrahidrofuránica de m-sulfobenzóato de hiamina 1622 preparada según a). Se enfría

22 21 93



hasta 5°C \pm 1, agitando y bajo atmósfera de nitrógeno. Se ajusta el pH de la solución a 10 con trietilamina y, después, se introduce 1 cm³ de cloroformiato de etilo redestilado. La temperatura del medio sube ligeramente y, después, retorna a 5°C. Se mantiene entonces a esta temperatura durante 30 minutos. Seguidamente, se añaden 3 cm³ de una solución de formiato de trietilamina al 10% en tetrahidrofurano.

Se obtiene así una solución de anhídrido mixto del ácido m-sulfobenzoico.

c) Preparación del N-(3-sulfobenzoil) N-desulfo heparina (sal de sodio)

A la solución de anhídrido mixto del ácido m-sulfobenzoico, se añaden 30 cm³ de una solución tetrahidrofuránica al 10% de N-desulfoheparinato de himina 1622. El recipiente que ha contenido el N-desulfoheparinato de himina 1622, se enjuaga con 10 cm³ de tetrahidrofurano. Se agita la mezcla durante una hora a + 5°C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se evapora seguidamente hasta sequedad bajo vacío. El residuo amorfo se redissuelve en 50 cm³ de butanol saturado de agua. La solución de N-(m-sulfobenzoil) N-desulfoheparina, se agota entonces con 10 cm³, 10 cm³ y, finalmente, con 5 cm³ de una solución acuosa al 20% de acetato sódico. La fase acuosa decantada se filtra y se vierte en 100 cm³ de metanol. El precipitado de sal sódica se separa finalmente por filtración, se filtra con succión, se lava y se seca.

Se obtienen así 1,05 g de N-(3-sulfobenzoil) N-desulfoheparina (sal de sodio), o sea un rendimiento de un 75%. Contenido en -NH₂ < 4% (expresado en N-desulfohe-

23 11 34



parina)

S 11,5% (teoría : 11,88).

Espectro U.V. (en ácido clorhídrico N/10) :

inflexiones hacia 230 m/ μ E $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ = 79,5
 hacia 270 m/ μ E $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ = 6,6

5

Esta absorción corresponde a $1,06 \times 10^{-3}$ moles/g de ácido m-sulfobenzóico (teoría : $1,35 \times 10^{-3}$). El índice de amidificación es, por lo tanto, del orden de 80%.

10

Actividad anticoagulante : 29 UAT/mg.

Este compuesto no está descrito en la bibliografía.

15

Tal como ha sido indicado más arriba, las N-(sulfobenzóil) N-desulfo heparinas pueden ser utilizadas para el tratamiento de las trombosis, tromboflebitis, embolias, amenazas de infarto pulmonar o cardíaco, arteritis, angina de pecho, y trastornos tróficos postflebíticos.

20

Poseen especialmente la ventaja sobre la heparina de ejercer una acción prolongada que evita las inyecciones intravenosas repetidas o las perfusiones venosas continuadas que representan dosis de heparina muy elevadas. Poseen, además, la ventaja sobre los anticoagulantes derivados de la dicumarina de actuar con rapidez y durante un espacio bien determinado, mientras que los derivados de la dicumarina que inhiben la síntesis de la trombina en el hígado (antagonistas de la vitamina K) son de una acción tardía pero cuya duración no puede preverse con certeza.

25

30

Finalmente hasta donde se sabe, la acción de las N-(sulfobenzóil) N-desulfo heparinas se manifiesta sobre

23 21 93



todos los estados de la coagulación, lo que hace su acción más segura y menos peligrosa para el organismo.

Las N-(sulfobenzoil) N-desulfo heparinas se administran por vía intravenosa. No actúan por vía bucal.

5

La posología útil se escalona entre 400 mg y 2 g por día para el adulto, en función de la vía de administración.

Acción retardada por vía intravenosa.

10

Esta acción ha sido estudiada en el conejo. Se ha medido determinando el tiempo de coagulación a intervalos regulares (2, 4, 6, 8, 10 horas después de la inyección intravenosa del compuesto estudiado). Los compuestos han sido administrados en dosis de 10 mg/kg y de 20 mg/kg. Se han obtenido los resultados siguientes:

Compuesto administrado	Actividad anticoagulante			
	10 mg/kg		20 mg/kg	
	Número de UI/kg	Duración de acción	Número de UI/kg	Duración de acción
Heparina	1 350	4 h	2 700	6-7 h
N-(2-sulfobenzoil) desulfo heparina	340	6 h	680	9 h
N-(3-sulfobenzoil) desulfo heparina	250	3 h		
N-(3,5-disulfobenzoil) desulfo heparina	300	2 h	600	3 h
N-(2,4-disulfobenzoil) desulfo heparina	200	6-7 h	440	9-10 h



29 01 93



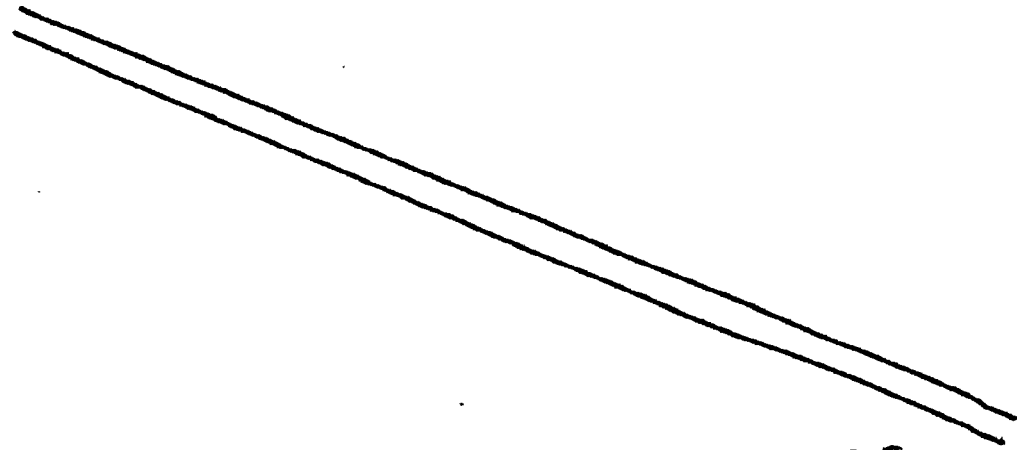
5 Tal como resulta de esta tabla, las N-(sulfobenzoyl) N-desulfo heparinas poseen una acción anticoagulante prolongada para dosis anticoagulantes (expresadas en unidades internacionales) infinitamente más débiles que las que se necesitan de heparina, para obtener un efecto del mismo orden.

10 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Francia, el 27 de Julio de 1962, bajo el número P.V. 905.336, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

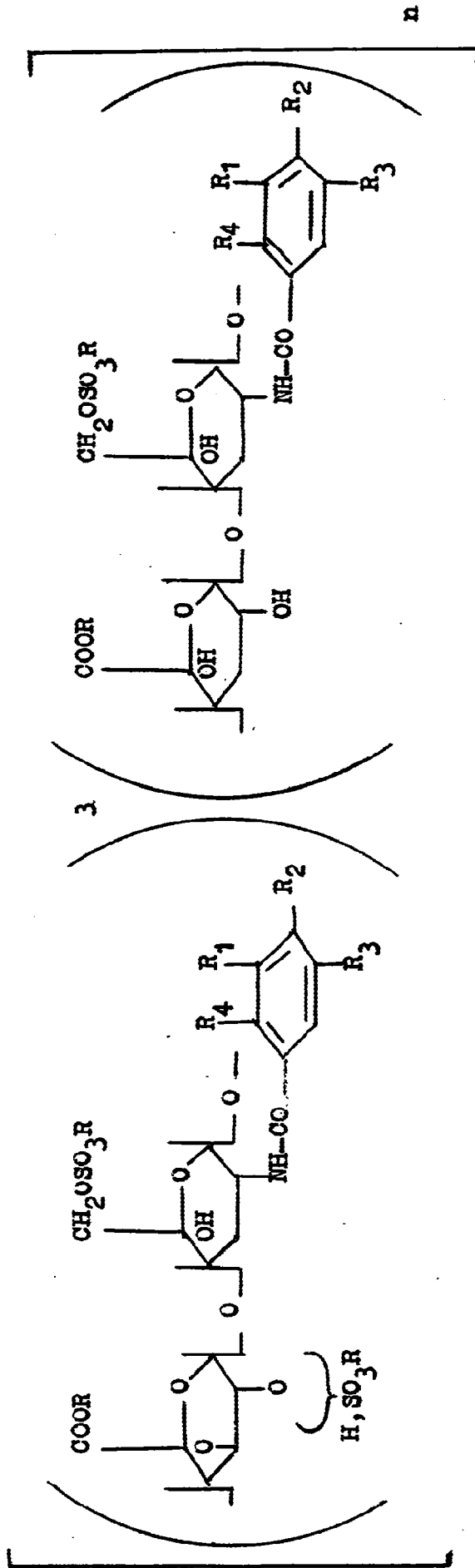
N O T A

15 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:

20 1ª.- Procedimiento de preparación de N-(sulfobenzoyl) N-desulfo heparinas y de sus sales de metales alcalinos de la fórmula general:



29 01 93



196

290193



en la cual R representa un átomo de hidrógeno o de metal alcalino, R_1 , R_2 , R_3 y R_4 representan simultáneamente o distintamente un átomo de hidrógeno o el grupo sulfónico libre o salificado, estando excluido el que $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 =$ hidrógeno, caracterizado por que se transforma la N-desulfo heparina en una sal de amonio cuaternario de larga cadena de carbonos, se hace reaccionar sobre esta sal de amonio cuaternario el anhídrido o un anhídrido mixto de un ácido benzoico mono- o polisulfonado, y se transforma finalmente, llegado el caso, la amida resultante en sal de un metal alcalino, por acción de un acilato inferior de metal alcalino.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado por que las sales de amonio cuaternarias que convienen particularmente para la preparación de las sales de amonio cuaternarias de la N-desulfo heparina, son preferentemente la hiamina 2389 que es el cloruro de trimetil (metildodecilbenzil)amonio, el Arquad 20 o cloruro de dilauril-dimetilamonio y, especialmente la hiamina 1622 o cloruro de benzildimetil 2 \sphericalangle 2-(p-1,1,3,3-tetrametilbutilfenoxi)-etoxi \sphericalangle etilamonio.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado por que el anhídrido o anhídrido mixto de un ácido benzoico mono- o polisulfonado que se hace reaccionar sobre la sal de amonio cuaternario de la N-desulfo heparina, es preferentemente el anhídrido o-sulfobenzoico, anhídrido de ácido 2,4-disulfobenzoico, anhídrido mixto del ácido 3,5-disulfobenzoico y del ácido ethoxycarbónico, o anhídrido mixto de ácido m-sulfobenzoico y del ácido ethoxycarbónico.

29 01 93



4a.- Procedimiento según la reivindicación 1a, ca-
racterizado por que el acilato inferior de un metal alcali-
lino que se emplea para la obtención de las sales alcali-
nas de N-(sulfobenzoil) N-desulfo heparinas, es, preferen-
5 temente, acetato de sodio.

5a.- Procedimiento de preparación de N-(sulfoben-
zoi) N-desulfo heparinas.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y para los fines que se han especificado.

10 Esta Memoria consta de veinte hojas escritas a má-
quina por una sola cara.

Madrid, 22 JUL 1963

29 01 93