

31



332955

P A T E N T E
D E
I N V E N C I Ó N

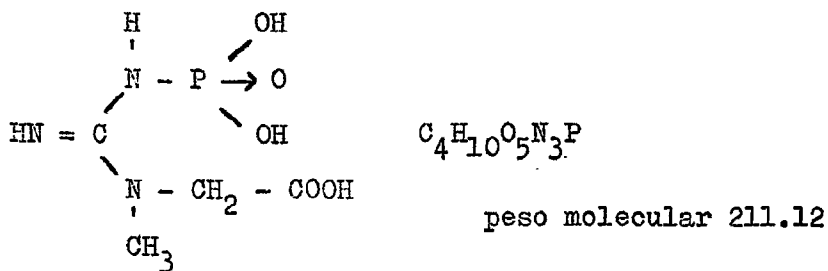
por "PROCEDIMIENTO PARA OBTENER SALES DE FOSFOCREATINA DE GRAN PUREZA PARA UTILIZACION TERAPEUTICA", a favor de la firma italiana STAB. CHIMICI FARM. RIUN. "SCHIAPPARELLI" S.p.A., domiciliada en 86, Corso Belgio, TURIN (Italia).

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un método para purificar sales de fosfocreatina para uso terapéutico, particularmente las sales de calcio, potasio, sodio y magnesio.

La fosfocreatina, conocida por otra parte como
5. fosfageno, ácido creatin-fosfórico o N-fosforil-creatina, tiene la fórmula general



- Fue reconocida por G.P. y P. Eggleton en el músculo de la rana y aislada por Fiske y Subbarow del tejido muscular los vertebrados (Biochemical Journal 21, 190 -1927- y J. Biol. Chem. 81, 629 -1929-). Zeile y Fawaz describieron un método de síntesis en el que la creatina se fosforila con cloruro de fosforilo y se aísla la fosfocreatina por precipitaciones y extracciones (K. Zeile y G. Fawaz; Hope Seyler's Zeit. Phys. Ch. 256, 193 -1938- y patentes alemanas 725033 y 715717). Un método semejante fue adoptado también por A.H. Ennor y L.A. Stochen (Bioch. J. 43, 190 -1948- y Bioch. Prep. 5, 9 -1957-). Anatol (patente francesa Nº 1.210.435) patentó un método de síntesis que parte de isotiouréidos substituídos y de sarcosinato de etilo. Ciertos métodos analíticos utilizan resinas cambiadoras de iones para aislar la sustancia de extractos tisulares (L.G. Abood: Science 1, 123, 545 -1956-).

El invento que aquí se expone proporciona un método para obtener sales de fosfocreatina para uso terapéutico, el cual comprende aislar de una mezcla de fosforilación de crea-



tina los iones de fosfocreatina, por medio de una resina cambiadora fuertemente aniónica, eluir de la resina dichos iones y precipitar éstos en forma de la sal cálcica.

5. La fosforilación de la creatina da una suspensión en la que la fase líquida contiene en solución Na^+ , Cl^- , OH^- , PO_4^- , iones de fosfocreatina, iones de creatina e iones de polifosfato. La fase sólida comprende cristales de fosfato sódico y polifosfato sódico. La fase sólida puede separarse por centrifugación, y los iones de fosfato y cualquier ion de polifosfato pueden convertirse en la fase sólida para eliminación por tratamiento con iones de calcio. Los iones de hidroxilo pueden neutralizarse con una resina cambiadora fuertemente catiónica que lleve iones de hidrógeno. Los iones de fosfato de creatina se fijan en la resina cambiadora aniónica.
- 10.
- 15.

- A continuación se eluyen y precipitan en forma de la sal cálcica los iones de fosfato de creatina. Dicha sal cálcica está en forma bruta, por lo que pueden contener algunas impurezas secundarias. Esta sal tiene un título de 96-97% y es enteramente activa en el aspecto biológico, como puede verse por una prueba enzimática. El rendimiento total de producto de aislación es de ordinario de un 90%. La sal puede purificarse todavía apropiadamente para uso terapéutico.
- 20.

- Así pues, además de los tres pasos esenciales del método del invento, o sea la fosforilación de la creatina y eliminación de los iones inorgánicos de la suspensión resultante, la percolación en resina cambiadora fuertemente aniónica
- 25.



- ca y elución de la fosfocreatina y, por último, la precipitación de la sal cálcica bruta, dicha sal cálcica bruta puede purificarse disolviéndola en agua y precipitándola por medio de un disolvente miscible en agua. Las sales potásica y sódica
5. pueden prepararse por cambio de iones con una resina cambiadora cationica, con los iones apropiados; y la sal magnésica puede prepararse por cambio doble, utilizando una sal inorgánica de magnesio, con ventaja el sulfato de magnesio.

10. Puede verse que el método de este invento tiene la ventaja de la sencillez sobre los métodos industriales empleados antes, debidos a Zeile y Fawaz, que requieren una serie de pasos de precipitación y extracción. El invento aquí expuesto constituye una mejora por cuanto proporciona las ventajas siguientes:

15. - pocos pasos, un producto puro que comprende únicamente fosfocreatina, posibilidad de automatización y grandes rendimientos.

El invento se describe a continuación en una modalidad específica por medio del ejemplo que sigue.

EJEMPLO

Fosforilación - A partir de 4,600 kg de creatina natural (peso molecular, 149,16) se obtienen alrededor de 220 litros de suspensión de fosforilación por el procedimiento de Zeile y Fawaz. En esta suspensión se hallan 1,550 a 1,600 kg de



fosfocreatinato sódido (peso molecular, 327,16; prueba enzimática), junto con cloruro sódico, hidróxido sódico, creatinato sódido, fosfato sódido y polifosfato sódico.

Eliminación del fósforo inorgánico - Después de centrifugar, se lava el residuo.

5. Se ajusta el volumen de líquido a 260 a 300 litros por dilución con agua desionizada y se corrige el pH de 11,5 a 8,5 por medio de resina cambiadora fuertemente catiónica H^+ (como la Zerolit 225). Para eliminar todo el fósforo inorgánico, se añaden a $0^{\circ}C$, agitando y gradualmente para mantener el pH entre 8 y 8,5, 60 litros de solución al 10% en volumen de $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ y pequeñas porciones de suspensión al 4% de $Ca(OH)_2$ en agua. Se separa el precipitado por centrifugación y se le filtra.
- 10.

- Aislamiento de la fosfocreatina.- Luego se aísla la fosfocreatina en una resina cambiadora fuertemente aniónica. El aparato utilizado en este paso comprende dos columnas de material termoplástico transparente, cada una de 110 cm de altura y 50 cm de diámetro interno (parte cilíndrica). Se estableció una calota superior dotada de un distribuidor de duchas y una calota inferior especial con un tabique de material poroso y un cojín de aire subyacente. En cada una de las columnas se formó un lecho de resina cambiadora aniónica utilizando una resina industrial Cl^- . La resina tenía una granulación esférica de 20-50 mallas, 8% de reticulación y una capacidad de 1,1 equivalentes/litro aproximadamente de resina húmeda (como la Nalcite SER). Los lechos de resina se mantuvieron a $+3^{\circ}C$, tenían 70 cm de altura y 50 cm de diámetro y el volumen total era de 275 litros aproximadamente. A $0^{\circ} + 4^{\circ}$ y con una velocidad de paso de $3,5 \text{ cc/cm}^2/\text{minuto}$, se procedió
- 15.
- 20.
- 25.



a la percolación del filtrado obtenido antes, pero diluido con agua desionizada para que su concentración fuera de 0,005-n respecto a los cloruros. El pH se mantuvo entre 7,8 y 8. La dilución del percolante se efectuó con una bomba medidora en el conducto de alimentación.

5. Los iones de fosfocreatina quedaron retenidos por la resina. Terminada la percolación, se procedió al lavado con dos volúmenes de agua desionizada y se eluyó a $0^{\circ} + 4^{\circ}$ la fosfocreatina con CaCl_2 a concentración 0,2 molar + MgCl_2 a concentración 0,5 molar, con pH de 7,5 y a la velocidad de 0,1 cc/cm²/minuto. Se desechó la primera porción del eluato (la mitad del volumen del lecho) y se recogió la porción siguiente.

20. Una cantidad de eluente igual a tres veces el volumen del lecho es suficiente para efectuar la elución completa de la fosfocreatina.

25. El fosfocreatinato cálcico se precipitó por adición al eluato de tres volúmenes de un disolvente miscible con el agua. Se obtuvieron 1,450 a 1,500 kg de sal cálcica bruta, realizando un rendimiento del 88-91% (prueba enzimática) respecto a la cantidad presente en la mezcla de fosforilación.

Preparación de sales de utilidad terapéutica - La sal cálcica pura ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_5\text{N}_3 \text{PCa} \cdot 3/2 \text{H}_2\text{O}$) se obtiene disolviendo en agua la sal bruta, filtrando y reprecipitando por medio de disolventes miscibles con el agua. Esta sal aparece en forma de un polvo cristalino blanco, poco soluble en agua (0,6% a 20°C). Las sales sódica y potásica se obtienen a partir de

30.



la sal cálcica bruta por cambio con resina fuertemente catiónica Na^+ o K^+ , respectivamente (como Zerolit 225), y precipitación consecutiva con disolventes miscibles en agua, como el etanol.

5. La sal sódica ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_5\text{PNa}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) está presente en forma de pequeñas escamas, muy solubles en agua (alrededor del 30% a 20°C). La sal potásica ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_5\text{PK}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) es un polvo microcristalino blanco, muy soluble en agua.

El rendimiento asciende al 90%.

10. La sal magnésica ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_5\text{N}_3\text{PMg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) se obtiene por cambio doble de la sal cálcica con sulfato magnésico y precipitación consecutiva. La sal se halla en forma de gránulos blancos, muy solubles en agua.

El rendimiento asciende al 90%.

15. Todas estas sales tienen propiedades bastante buenas de conservabilidad a 0°C y en ausencia de humedad libre.

Análisis - La identidad y la preza de los diversos productos se determinan con las pruebas siguientes:

20. Determinación enzimática de la fosfocreatina: según E.N. Fawaz, G. Fawaz y K. von Dahl (Proc. Soc. Exp. Biol. Mec. 109, 38 (1962)).

Determinación del fósforo total: según Fiske y Subbarow (después de hidrólisis en HCl 0,1-n, durante 10 minutos, a 65°C), (Journal Biol. Chem. 66, 375 (1925)).



Determinación de la creatina total: según Jaffe
(Después de calentamiento a 90°C durante 3½ horas, en
tampón de citrato de 0,15 de concentración molar y pH 2,2;
se trata del mismo modo el patrón de creatina), (H. Mollwain,
5. L. Buckel, J.D. Cheshire, Bioch. J. 48, 12 (1951), J.F. van
Pilsun, Bioch. Anal. 7, 193 (1959)).

Determinación del agua total: según K. Gischer.

Cromatografía de papel: según Caldwell (Bioch. J.
10. 55, 458 (1953). (Deben depositarse 20 microlitros de una
solución de 5 mg/microlitro.)

He aquí los datos analíticos referentes al fosfo-
creatinato sódico ($C_4H_8O_5N_3PNa_2 \cdot 4H_2O$):

Peso molecular: 327,16

Contenido enzimático: 98,5%

15. Fósforo total: 9,4% (en teoría, 9,47%)

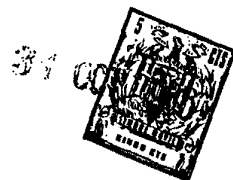
Creatina total: 40% (en teoría, 40,08%)

Agua total: 21,6% (en teoría, 22,03%)

20. Cromatografía de papel: mancha única en $R_f = 0,29$ (tan solo
cuando los depósitos son de 4 a 6 ve-
ces mayores, existen vestigios de
creatina libre (0,1%; $R_f = 0,47$) y de
fosfato inorgánico (0,2%; $R_f = 0,20$).

Resultados semejantes pueden obtenerse con las

= 9 =



otras sales. Puede verse, por lo tanto, que todo el fósforo y toda la creatina se hallan en forma de fosfocreatina biológicamente activa.

= . =

N O T A

Descrito el objeto de la invención, se declara nuevas las siguientes reivindicaciones, con prioridad italiana nº 24660/65 del 2 de noviembre de 1965:

5.

1. Procedimiento para obtener sales de fosfocreatina de gran pureza para utilización terapéutica, caracterizado por los pasos de aislar de una suspensión de fosforilación de creatina los iones de fosfato de creatina, por medio de una resina fuertemente aniónica, eluir de la resina dichos iones y precipitar éstos en forma de sal cálcica.

10.



2. Procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado en que previamente se priva a la suspensión de su fase sólida, de los iones de fosfato, de los iones de polifosfato y de los iones de hidroxilo.
5. 3. Procedimiento como se define en las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado en que los iones de fosfato y los iones de polifosfato se separan por medio de iones de calcio.
10. 4. Procedimiento como se define en las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado en que los iones de hidroxilo se separan por contacto con una resina catiónica fuerte e iones de hidrógeno.
15. 5. Procedimiento según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado en que la sal cálcica precipitada se disuelve en agua y se vuelve a precipitar por medio de un disolvente miscible en agua.
20. 6. Procedimiento como se define en las reivindicaciones precedentes, caracterizado en que la sal cálcica precipitada del eluato se pone en contacto de cambio iónico con una resina catiónica fuerte, de iones de sodio o de potasio, para obtener la sal sódica o la potásica, respectivamente.
25. 7. Procedimiento como se define en las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado en que la sal cálcica precipitada del eluato se convierte en sal magnésica por cambio doble con sulfato de magnesio.



8. Procedimiento como se define en las reivindicaciones 6 y 7, caracterizado en que la sal sódica, potásica o magnésica se disuelve en agua y se vuelve a precipitar por medio de un disolvente miscible en agua.

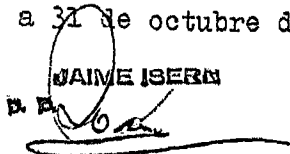
5. 9. Procedimiento para obtener sales de fosfocreatina de gran pureza para utilización terapéutica.

Según se describe y reivindicada en la presente memoria que consta de 11 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

10.

Madrid, a 31 de octubre de 1966

p.a.


Firmado: JOSÉ KUUMOUZ