



CASE BE-1414

419708

F.E. 27-8-75

Cl. CI: COBB//ACIK

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

por "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR SALES DE SULFOGLICO-PEPTIDOS", a favor de la firma italiana CRINOS INDUSTRIA FARMACOBIOLOGICA S.p.A., residente en Piazza XX Settembre 2 VILLA GUARDIA (Italia).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un grupo de nuevas sales derivadas de glicopéptidos sulfatados y a un procedimiento para su preparación.

5. Se conocen sales de ésteres polisulfúricos de glicopéptidos (sulfoglicopéptidos) con metales alcalinos, alcalinotérreos y metales pesados que están dotadas de propiedades antiinflamatorias. Sin embargo, estas sales, para ser utilizadas con fines terapéuticos, requieren tratamientos particulares después de su obtención o

419708



5. precauciones particulares de aplicación apropiadas para reducir su toxicidad. Esto es particularmente aplicable a sales derivadas de metales pesados de metales alcalino-térreos como es el bario, que tienen por lo general mayor o menor grado de toxicidad.

10. Ahora se ha descubierto y es un objeto de este invento, que es posible obtener también de los sulfoglicopéptidos antes citados sales con aminoácidos naturales o sintéticos. Estas sales están prácticamente exentas de actividad tóxica y poseen una actividad antiinflamatoria superior que la de las sales de sulfoglicopéptidos ya conocidas. Por consiguiente, un objeto de este invento consiste en obtener sales de sulfoglicopéptidos con aminoácidos naturales o sintéticos.

15. Otro objeto de este invento consiste en proporcionar un procedimiento para la preparación de dichas sales a partir de los sulfoglicopéptidos en forma ácida y a partir del aminoácido libre.

20. El éster polisulfúrico de glicopéptido se obtiene, de preferencia, en su forma de ácido libre, a partir de la sal sódica o amónica correspondiente, disolviéndolo en agua y filtrándolo a través de un lecho de resina catiónica fuerte como, por ejemplo, el tipo conocido con la marca AMBERLITE IR 120, producido por la compañía ROHM y HAAS. La solución acuosa que se obtiene después de este tratamiento contiene la forma ácida del sulfoglicopéptido y se caracteriza por una fuerte acidez que corresponde a un pH inferior a 1.

25. A la solución ácida de sulfociclopéptido se



419708

le adiciona directamente al aminoácido libre, caso de encontrarse disponible bajo dicha forma, o bien se adiciona una solución acuosa del aminoácido preparada aparte, en caso de que éste se encuentre disponible en forma de un derivado, por ejemplo una sal. La cantidad del aminoácido adicionada a la solución ácida de sulfoglicopéptido, es de preferencia, ligeramente superior (5%) que la cantidad estequiométrica requerida.

5.

Las soluciones acuosas del producto así obtenidas se caracterizan por un valor pH que depende de la naturaleza del aminoácido utilizado. Este valor es, por lo general inferior a 3, en el caso de aminoácidos neutros y acídicos, mientras que se aproxima a la neutralidad en el caso de aminoácidos básicos. Para separar de las soluciones así obtenidas una fracción de aminoácido en exceso o sales inorgánicas eventualmente presentes, estas soluciones pueden someterse a un tratamiento de diálisis adecuado antes de proceder a la separación del producto.

10.

15.

20.

La separación y purificación del producto, constituido por la sal de sulfoglicopéptido con el aminoácido, de sus soluciones acuosas puede llevarse a cabo finalmente según dos formas distintas:

25.

- A) por precipitación después de dilución con disolventes selectivos y secado subsiguiente bajo vacío a unos 50°C (la expresión "disolvente selectivo" significa un disolvente miscible en agua en donde la sal que ha de purificarse es insoluble) o
- B) por concentración bajo presión reducida seguido de

419708



liofilización.

En calidad de sulfoglicopéptidos preferidos, pueden utilizarse los derivados de órganos o tejidos animales, según el procedimiento descrito en la patente estadounidense nº 3.518.243 de A. Butti y colaboradores.

5.

Las sales de dichos sulfoglicopéptidos con aminoácidos naturales o sintéticos ejercen una considerable acción farmacológica antiinflamatoria y se manifiestan particularmente útiles como medicamentos para el tratamiento de los fenómenos ulcerosos del estómago y del duodeno. Actualmente, en las pruebas efectuadas con animales experimentales, exhiben las propiedades farmacológicas siguientes:

10.

15.

20.

25.

- A) reducción de la úlcera debido a la ligazón del píloro y a la hidrocortisona y la histamina con una dosis de 10-20 mg/kg por vía endoperitoneal y de 50-100 mg/kg por vía oral,
- B) inhibición de la actividad péptica del jugo gástrico ya sea "in vivo" (50 mg/kg por vía oral) e "in vitro" (100 microgramos/cc),
- C) aumento de la velocidad de cicatrización de las úlceras crónicas experimentales con una dosis de unos 100 mg/kg/día, por vía oral,
- D) inhibición del edema local en las ratas debido a la carragenina, la serotonina y el caolín, con una dosis de 3-5 mg/kg, por vía parenteral,
- E) inhibición de la hipersecreción inducida en las ratas con histamina, gastrina y betanecol (carbinoil-beta-metilcolina) con una dosis de 1 mg/kg, por vía



intravenosa.

No se observaron fenómenos tóxicos en ratas o ratones después de un tratamiento único con 300 mg/kg, administrado por vía oral.

5. Las sales de conformidad con este invento y el procedimiento respectivo para su preparación se describirá ahora mejor en los ejemplos que siguen los cuales se ofrecen para la ilustración del invento sin que implique limitación.

10. EJEMPLO 1

Sal histidínica de sulfoglicopéptido

- Se disuelven 20 g de sal sódica de sulfoglicopéptido en 200 cc de agua destilada y se filtra la solución a través de un lecho de resina de intercambio catiónico AMBERLITE IR 120 (H⁺) contenido en una columna con un diámetro de 25 mm. A continuación se lava la resina con otros 150 cc de agua destilada que se adicionan al líquido ya filtrado; se adiciona la solución así obtenida a una solución de histidina preparada tratando una solución de 18 g de clorhidrato de histidina en 100 cc de agua con 3,7 g de hidrato sódico.

- Después de la reacción se diluye el conjunto en 1500 cc de etanol, se recoge el precipitado por centrifugación y se lava tres veces con una solución de etanol/agua en una proporción de 3 a 1 por volumen. Por último, el polvo que se obtiene se seca bajo vacío a 50°C. Se obtienen 22 g de producto cuyo análisis ofrece los porcentajes siguientes expresados en peso:



419708

5.	Histidina	= 45%
	Sulfoglicopéptido	= 65%
	Nitrógeno	= 11,65%
	Azufre sulfónico	= 10,16%
	Sodio	= 1,45%
	Hexosas	= 9,9%
	Hexosaminas	= 12,8%
	Grupos acetílicos	= 3,4%
	Acido siálico ⁺	= 1,85%
10.	Proteínas	= 6,3%
	Humedad	= 4,5%

⁺ = Acido N-acetil-neuramínico.

EJEMPLO 2

Sal lisínica de sulfoglicopéptido

15. La sal lisínica de sulfoglicopéptido se prepara de modo análogo al método ilustrado en el ejemplo precedente a partir de 16 g de monoclórhidrato de lisina y 20 g de sulfoglicopéptido en forma de sal sódica. Se obtienen 21,7 g de producto cuyo análisis ofrece los porcentajes gravimétricos siguientes:

20.	Lisina	= 34%
	Sulfoglicopéptido	= 66%
	Azufre sulfónico	= 10,24%
	Sodio	= 2,01%
25.	Nitrógeno	= 8,78%
	Hexosas	= 10,2%
	Hexosaminas	= 13,5%



Grupos acetilicos	= 3,6%
Acido siálico	= 1,92%
Proteinas	= 6,4%
Humedad	= 4,7%

5.

EJEMPLO 3

Sal glutamínica de sulfoglicopéptido

10.

Se disuelven 25 g de sal sódica de sulfoglicopéptido en 250 cc de agua destilada y se filtra la solución a través de un lecho de resina de intercambio AMBERLITE IR 120 (H⁺) contenida en una columna con un diámetro de 25 mm. A continuación se lava la resina con otros 150 cc de agua destilada que se adiciona al líquido ya filtrado; se adicionan a las soluciones reunidas, bajo agitación 15,5 g de l-glutamina. El pH

15.

de la solución obtenida es de 2,5. Luego se dializa la solución durante una noche a una temperatura de 40°C frente al agua destilada a través de una membrana de celulosa regenerada con un grosor de 0,03 milímetros.

20.

Se concentra la solución bajo presión reducida a una temperatura de 40°C hasta un volumen total de 200 cm³ y luego se liofiliza. El análisis de 35 g del producto obtenido dá los datos siguientes:

25.

Glutamina	= 42%
Sulfoglicopéptido	= 58%
Nitrógeno	= 10,04%
Azufre sulfónico	= 9,05 %
Sodio	= 0,5 %



5.	Hexosas	= 8,9%
	Hexosaminas	= 10,8%
	Grupos acetilicos	= 2,9%
	Acido siálico	= 2,9%
	Proteinas	= 5,4%
	Humedad	= 4,4%

EJEMPLO 4

Sal metionínica de sulfoglicopéptido

10. Se disuelven 25 g de sal sódica de sulfoglicopéptido en 250 cc de agua destilada y se filtra la solución a través de un lecho de resinas de intercambio AMBERLITE IR 120 (H⁺) contenida en una columna con un diámetro de 25 mm. A continuación se lava la resina con otros 150 cc de agua destilada que se adicionan a la solución ya filtrada; se adicionan a las soluciones reunidas,

15. bajo agitación, 15 g de dl-metionina, Se dializa la solución durante 12 horas a una temperatura de 40°C frente al agua destilada a través de una membrana de celulosa regenerada con un espesor de 0,03 milímetros.

20. Se concentra la solución bajo presión reducida y a 40°C hasta que se obtiene un volumen total de 200 cc y luego se liofiliza. Se obtienen 35,4 g de producto cuyo análisis ofrece los datos siguientes expresados en % en peso.

25.	Metionina	= 43,4%
	Sulfoglicopéptido	= 56,5%
	Nitrógeno	= 6%
	Azufre sulfónico	= 9,95%

419708



	Sodio	= 0,5%
	Hexosas	= 8,7%
	Hexosaminas	= 10,5%
	Grupos acetílicos	= 2,8%
5.	Acido siálico	= 1,5%
	Proteínas	= 5,3%
	Humedad	= 4,6%

EJEMPLO 5Sal asparagínica de sulfoglicopéptido

10. La sal asparagínica de sulfoglicopéptido se preparó siguiendo el procedimiento ilustrado en los ejemplos 3 y 4. El análisis del producto final da los porcentajes siguientes:

	Asparagina	= 35%
15.	Sulfoglicopéptido	= 65%
	Nitrógeno	= 9,6%
	Azufre sulfónico	= 10,1%
	Sodio	= 0,4%
	Hexosas	= 9,4%
20.	Hexosaminas	= 13,00%
	Grupos acetílicos	= 3,4%
	Acido siálico	= 1,8%
	Proteínas	= 6,2%
	Humedad	= 4,5%

25. Asimismo, según el procedimiento ilustrado en los ejemplos 3 y 4 se prepararon otras sales de sulfoglicopéptidos con diferentes aminoácidos, cuyos datos analíticos se resumen en la tabla que sigue:



Ej.	Amino-ácido	Análisis (% en peso)								
		Amino-ácido	N	Sulfonico	Na	Hexas	Hexasaminas	Grupos acetilicos	Acidolico	Proteinas
5.	6 Arginina	44,0	16,5	9,0	0,5	8,7	10,0	2,8	1,5	5,3
	7 Cisteina	36,0	6,15	10,0	0,7	9,0	12,7	3,3	1,7	6,0
	8 Prolina	37,0	6,5	9,8	0,5	9,6	13,2	3,5	1,77	5,9
10.	9 Serina	32,5	6,6	10,62	0,4	10,5	13,5	3,6	1,9	6,4
	10 Treonina	36,0	6,2	10,04	0,5	9,0	12,5	3,4	1,55	6,0
15.	11 Triptofano	56,0	9,1	6,8	0,5	8,6	8,6	2,1	1,25	4,2

= .. =

N O T A

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente italiana nº 30582 A/72 del 18 de Octubre de 1972.

20.

1. Un procedimiento para preparar sales de sulfoglicopéptidos, caracterizado porque se hace reaccionar un sulfoglicopéptido directamente en su forma ácida

mE



con uno o más aminoácidos libres naturales o sintéticos.

5. 2. Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los aminoácidos naturales o sintéticos que se utilizan son alfa-aminoácidos.

3. Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el producto obtenido se separa por precipitación utilizando disolventes selectivos y subsiguiente secado bajo vacío.

10. 4. Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el producto se separa por concentración bajo presión reducida y subsiguiente liofilización.

15. 5. Un procedimiento para preparar sales de sulfoglicopéptidos,

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 11 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 17 Octubre 1973

p.a. JAIME ISERN
p. p.

Firmado: FELIPE PRIETO

af/e