

LF/av

S/Ref.: G.6300/V

N/Ref.: O.G. 28.730/AV



11 JUN 1971

A61K

427 177

PATENTE DE INVENCION

MEMORIA DESCRIPTIVA

Sobre:

"METODO DE PREPARACION DE GLUCORONIL-GLUCOSAMIN-GLICAN-SULFATOS DE ACTIVIDAD ANTILIPEMICA".

-----

Solicitante: La compañía italiana: OPOCRIN S.r.l. con domicilio en Via Pacinotti, FORMIGINE, Frazione Corlo  
(Modena) ITALIA

-----

Inventor : Pietro Bianchini.

-----



- La presente invención tiene por objeto un método - de extracción que permite obtener glucoronil-glucosamin-gli-- can-sulfatos de elevada actividad específica en sentido anti lipénico (10 a 20 U.LS./mg, siendo 1.U.LS el título de la --
5. cantidad de sustancia que, inyectada intravenosamente en un ratón de 200g, puede inducir después de 10 minutos la apari-- ción en círculo de lipoproteinolipasas capaces de provocar - un descenso del 50% en la densidad óptica de la mezcla 1:2 plasma:aceite de coco al 50% (del tipo conocido en el comer--
10. cio con el nombre registrado de "Ediol") in vitro, después de una incubación de 15 minutos.

- Estos productos se utilizan, como es sabido, en te rapéutica por su actividad hipolipemizante, pero los prepara dos actualmente usados no superan 1 U.LS./mg, siendo mucopoli
15. sacáridos policarboxilatos y polisulfonatos.

Su extracción implica un procedimiento de proteoli sis o de extracción alcalina al objeto de hidrolizar el pró-- tido glicano nativo y de liberar así la parte polisacárida.

- Algunos procedimientos conocidos para la prepara--
20. ción de los glucoronil-glucosamin-glican-sulfatos de activi-- dad antilipémica prevén sucesivamente una precipitación me-- diante disolventes del material extraído, la disolución del precipitado y ulterior purificación mediante diferentes méto-- dos, como la cromatografía sobre columna de resina y/o la --
25. precipitación selectiva de complejos y sales insolubles.

Estos procedimientos determinan, por su longitud - y complejidad, una notable pérdida de material y de tiempo y en general un título biológico bastante bajo en el producto final (1 a 2 U.LS/mg aproximadamente).

30. Ejemplos de un procedimiento de este tipo se des--



criben en las patentes inglesas Nos. 1.172.919 y 899.010.

Objeto fundamental de la presente invención es el de realizar un procedimiento que:

5. 1) permita obtener directamente productos de elevado grado de pureza y dotados de actividad antilipémica, desprovistos de sustancias anafilatógenas, de histamina y de pirógenos.

10. 2) prevea la precipitación selectiva de complejos insolubles en agua en la fase inmediatamente siguiente a la proteolisis o hidrolisis alcalina sobre el órgano animal tratado y ulterior separación del material contaminador mediante lavado del precipitado con una solución salina a adecuada concentración.

15. Tal procedimiento comprende las siguientes operaciones; se someten el duodeno o páncreas de animales a hidrolisis añadiendo a tales órganos una solución acuosa con un pH de 5 a 10 aproximadamente en presencia de un agente antibacteriano únicamente como inhibidor de la flora bacteriana; se mantiene la suspensión a 30-70°C durante un tiempo de hasta 48 horas fuera del contacto con el aire y se calienta luego la suspensión a 70-100°C durante 10 a 40 minutos; y se separan las partes sólidas, caracterizándose el método por el hecho de que se llevan a cabo las siguientes operaciones.

20. Se añade al líquido obtenido de la separación una base orgánica con una cadena alifática de 7 átomos de carbono por lo menos, en una cantidad comprendida entre el 1 y el 4% en peso respecto al del órgano animal tratado y se lleva el líquido a un pH de 7,5 a 8,5 con una solución al 20-40% - de una base inorgánica; se calienta el líquido a una temperatura de 70 a 100°C durante un tiempo de 2 a 20 minutos, para



- densificar el precipitado y favorecer su centrifugación; se separan las partes sólidas del líquido; se lava el precipitado primero con agua destilada y luego con una solución acuosa salina de una molaridad comprendida entre 0,5 y 1; se compleja el precipitado con una solución acuosa de la misma sal usada para el anterior lavado con molaridad comprendida entre 2,5 y 4; se precipita el compuesto deseado de la solución con un alcohol de un número de átomos de carbono inferior a 4 a un pH de 3 a 5.
- 5.
10. Preferiblemente, la hidrólisis a la que se someten los órganos animales (duodeno o páncreas) al comienzo del procedimiento es una hidrólisis enzimática que se efectúa con enzimas proteolíticas, tales como pepsina, tripsina, papaína, etc. En este caso, el pH de la solución acuosa de dichos órganos animales corresponde preferiblemente al óptimo de actividad de cada tipo de enzima utilizada en la hidrólisis.
- 15.
- Para mayor claridad se expondrán seguidamente algunos ejemplos de realización del método, cuyos ejemplos no son limitativos del ámbito de la protección reivindicada.
- 20.
- Ejemplo 1
- A 100 kg de duodeno de cerdo picado se añaden 10 kg de ClNa, 400 g de HONa y 200 litros de agua, obteniéndose un pH de 6 a 7 aproximadamente. Se mantiene la suspensión en ebullición durante 15 a 30 minutos, después de lo cual se enfría a 60°C, se añaden 1.500.000 U.I. de penicilina, 600 g de papaína (1:100), 600g de hiposulfito sódico y se deja incubar todo ello durante 16 horas a 60°C, después de lo cual se pone y mantiene en ebullición la mezcla durante 15 a 30 minutos y luego se centrifuga, filtrándose el líquido centrifugado.
- 25.
- 30.



Al líquido perfectamente limpio se añaden 3 litros de una base de amonio cuaternario formada por una mezcla compuesta por un 40% de cloruro metil-dodecil-bencil-trimetil--amónico, un 10% de bis(trimetil-amonio-cloruro) de metil-dodecil-xilileno y un 50% de agua.

5. Se pone el líquido a un pH de 7,7 con HONa al 30% se mantiene en ebullición durante 5 minutos para determinar la floculación del precipitado y se centrifuga o filtra (líquido a desechar).

10. Se lava el precipitado dos veces con 20 litros de agua destilada (agua de lavado a desechar) para separar la mezcla sobrante de eventuales sustancias pirógenas presentes en el precipitado destinado a formar el producto inyectable; luego se lava el precipitado con 20 litros de una solución 0,8 M ClNa (solución de lavado a desechar) para separar sustancias doblemente enlazadas (enlaces carboxílicos) a la base de amonio cuaternario, anteriormente usada, que no presenten actividad biológica.

20. Se trata el precipitado con 20 litros de solución de ClNa 3M para provocar el descomplejamiento de las únicas sustancias dotadas de actividad, se procede luego a una operación de centrifugación (sólido a desechar) y el líquido --centrifugado se lleva a un pH de 4,5 con ácido acético glacial.

25. Se añaden 1,5 volúmenes de metanol, se centrifuga y el precipitado centrifugado se disuelve en 50 litros de solución de ClNa 2M y se filtra hasta su limpieza.

Al líquido limpio, puesto a un pH de 4, se añaden 1,5 volúmenes de metanol.

30. Se centrifuga y se lava dos veces el precipitado -



con alcohol metílico y una vez con éter etílico.

5. Finalmente se seca el precipitado bajo vacío, de cuya operación se obtiene un producto inyectable, apirógeno, desprovisto de histamina y de sustancias anafilatógenas, constituido por sulfatos glucoronil-glucosamin-glicanos, de actividad clarificante alrededor de las 20 U.I.S.

La sustancia obtenida presenta además un contenido medio en ácidos hexurónicos de 180 mcg/mg, de 260 mcg/mg en sulfatos y de 310 mcg/mg en hexosaminas.

10. En el ejemplo anteriormente expuesto, se ha empleado la papaína como enzima proteolítica, pero el procedimiento puede efectuarse con cualquier otra enzima proteolítica, como la pepsina, tripsina y quimotripsina, adaptando en cada caso el pH y la temperatura de elaboración a la enzima empleada.

15. Puede seguirse el mismo procedimiento del ejemplo antes expuesto, utilizando reactivos distintos pero del mismo tipo que los especificados. Por ejemplo, la base de amonio cuaternario añadida al líquido limpio puede estar constituida por cloruro de n-alquil (50% C<sub>14</sub>-40% C<sub>12</sub>-10% C<sub>16</sub>) dimetilbencil-amonio; la solución salina empleada para el lavado del precipitado puede estar constituida por una solución de ClK 0,5M ó de CH<sub>3</sub>COONa 1M; la solución acuosa utilizada para descomplejar el precipitado puede estar constituida por una solución acuosa de ClK 3,5M ó de CH<sub>3</sub>COONa 2,5M.

#### Ejemplo 2

30. A 100 kg de páncreas bovino picado se añaden 15 kg de ClNa, 50 litros de agua, 1.500.00 U.I. de penicilina y HONa hasta un pH de 5 y se deja incubar todo ello durante 44 horas sobre 40°C, obteniéndose así una autólisis del páncreas.



La mezcla, puesta y mantenida en ebullición durante 15 minutos, es centrifugada y luego filtrada.

5. Al líquido perfectamente limpio, llevado a un pH de 8,2 con HOK al 25%, se añade 1 Kg de bromuro trimetil--acetil-amónico. La mezcla así obtenida se mantiene durante 10 minutos sobre 80°C para ayudar a la floculación del precipitado.

Luego se centrifuga el líquido y se filtra (líquido a desechar).

10. Se lava el precipitado dos veces con 20 litros de agua destilada (agua de lavado a desechar) y con 20 litros de una solución 0,5 M de CLK (solución de lavado a desechar). Luego se trata el precipitado con 20 litros de solución de CLK 4M para provocar el descomplejamiento de las únicas sustancias dotadas de actividad biológica.

15. Se centrifuga luego la solución (sólido a desechar) y se pone el líquido opalescente a un pH de 3,5 con ClH al 10%.

20. Se añaden 2 volúmenes de etanol, se centrifuga y se lava el precipitado centrifugado dos veces con alcohol metílico y una vez con éter etílico.

25. Se seca el precipitado bajo vacío; de esta operación se obtiene un producto inyectable, apirógeno, desprovisto de histamina y de sustancias anafilatógenas, constituido por sulfatos glucoronil-glucosamin-glicanos de una actividad -- clarificante superior a 20 U.IS./mg.

La sustancia obtenida presenta además un contenido en ácidos hexurónicos medio de 270 mcg/mg, en sulfatos de 270 mcg/mg y en hexosaminas de 330 mcg/mg.

- 30.

.../...



N O T A

La Patente de Invención que se solicita por veinte años para España, de acuerdo con la vigente Legislación, deberá recaer sobre: "METODO DE PREPARACION DE GLUCORONIL--

5. GLUCOSAMIN-GLICAN-SULFATOS DE ACTIVIDAD ANTILIPEMICA", con Prioridad de la Demanda de Patente en Italia nº 25371 A/73 de fecha 14 de Junio de 1973, según las características de las siguientes:

R E I V I N D I C A C I O N E S

10. 1ª.- Metodo de preparación de glucoronil-glucosamin-glican-sulfatos de actividad antilipemica, que comprende las siguientes operaciones: se someten el duodeno o páncreas de animales a hidrolisis añadiendo a tales órganos -- una solución acuosa de un pH de 5 a 10 aproximadamente, en
15. presencia de un antibacterico que actúa únicamente como inhibidor de la flora bacteriana; se mantiene la suspensión a 30-70°C durante un tiempo de hasta 48 horas fuera del contacto con el aire y luego se calienta la suspensión a 70-100°C durante 10 a 40 minutos; se separan las partes sólidas; caracterizándose el método porque se realizan las siguientes operaciones: se añade al líquido obtenido de la separación una
20. base orgánica con una cadena alifática de 7 átomos de carbono por lo menos, en una cantidad comprendida entre el 1,1 y el 4% en peso respecto al del órgano animal tratado y se pone el líquido a un pH de 7,5 a 8,5 con una solución al 20-40%
25. de una base inorgánica; se calienta el líquido a una temperatura de 70 a 100°C durante un tiempo de 2 a 20 minutos para densificar el precipitado y favorecer su centrifugación; se separan las partes sólidas del líquido; se lava el precipitado primero con agua destilada y luego con una solución --
- 30.



5. acuosa salina de una molaridad comprendida entre 0,5 y 1; se descompleja el precipitado con una solución acuosa de la misma sal usada para el precedente lavado, con una molaridad comprendida entre 2,5 y 4; y se precipita el compuesto deseado de la solución con un alcohol de un número de átomos de carbono inferior a 4 y un pH entre 3 y 5.

10. 2ª.- Método de preparación de glucoronil-glucosamin-glican-sulfatos de actividad antilipemica, según la reivindicación 1, caracterizado por que el compuesto final precipitado vuelve a disolverse con una solución salina 1-3M y se filtra hasta su limpieza, para precipitarse luego a un pH de 3 a 5 con un alcohol de un número de átomos de carbono inferior a 4.

15. 3ª.- Método de preparación de glucoronil-glucosamin-glican-sulfatos de actividad antilipemica, según la reivindicación 1, caracterizado porque la citada hidrolisis es una hidrolisis enzimática y porque el pH al que se lleva dicha solución acuosa de los citados órganos animales corresponde sustancialmente el óptimo de actividad de cada tipo de enzima utilizada en la hidrolisis.

20. 4ª.- Método de preparación de glucoronil-glucosamin-glican-sulfatos de actividad antilipemica, según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la solución acuosa salina usada para el lavado del precipitado es una solución de ClNa 0,8M, de ClK 0,5M ó de CH<sub>3</sub>COONa 1M.

25. 5ª.- Método de preparación de glucoronil-glucosamin-glican-sulfatos de actividad antilipemica, según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el precipitado es descomplejado con una solución acuosa salina constituida por ClNa 3M, ClK 3,5 ó CH<sub>3</sub>COONa 2,5M.

30.





6ª.- METODO DE PREPARACION DE GLUCORONIL-GLUCOSA-  
MIN-GLICAN-SULFATOS DE ACTIVIDAD ANTILEPTICA".

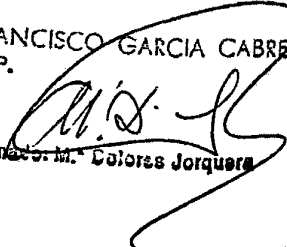
Según queda sustancialmente descrito en la presente  
Memoria que consta de diez hojas, escritas a maquina por una  
sola cara.

Madrid, 11 JUN. 1974

OPOGRIN S.nl.

P.P.

FRANCISCO GARCIA CABREIZO  
P.P.



Firmado: M. Dolores Jorquera

