

nn/ 22.347

4 OCT. 1976
CONCEDIDA

430297

MEMORIA DESCRIPTIVA
correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por 20 AÑOS

en ESPAÑA

Int. CL²: C07G//A61K

Solicitante: LABORATORIEN HAUSMANN AG

Nacionalidad: Suiza

Domicilio: 9001 St. Gallen (Suiza)

Enunciado: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR GELATINA MODIFICADA
CON PUNTO DE FUSION DE GEL REBAJADO".

Prioridad: Solicitud correspondiente a la Patente depositada
en Alemania bajo el n^o P 23 48 294.2 de fecha 26
de Septiembre de 1.973.

.....



1974

La presente invención se refiere a una gelatina modificada con punto de fusión de gel rebajado y un peso molecular medio de como mínimo aproximadamente 20.000 así como un procedimiento para la obtención de la misma.

- 5.- La gelatina y gelatinas químicamente modificadas se utilizan dentro de un amplio margen para diferentes fines técnicos.- Para casi todas las aplicaciones técnicas de la gelatina resulta esencial la formación de gel, que se produce al enfriar sus soluciones acuosas producidas en caliente. Una gelatina rige normalmente como "correcta" cuando el punto de fusión del gel se encuentra relativamente alto para una concentración predeterminada y el gel es mecánicamente consistente. Existen sin embargo fines de aplicación, en los que la capacidad de gelatinización resulta innecesaria o incluso indeseable. Una de tales utilizaciones es por ejemplo su aplicación como coloide en medios sustitutivos del plasma respectivamente soluciones para transfusión, que clínicamente pueden ser aplicadas por ejemplo para el tratamiento del shock. Tales soluciones con aproximadamente un 3-5% de gelatina deberán mantenerse en lo posible líquidas hasta cerca de 0° C. Una solución del 4% aproximadamente de una gelatina del tipo comercial con un peso molecular (M) de 30.000 a 70.000 se gelatiniza a temperaturas entre los 24° y 32° C y es por tanto inadecuada para el uso directo como coloide en un medio sustitutivo del plasma sanguíneo.
- 10.-
- 15.-
- 20.-
- 25.- Aún cuando resulta posible rebajar casi a voluntad el punto de fusión de gel, cuando se desintegra hidrolíticamente la gelatina, por consiguiente se rebaja el peso medio molecular. Sin embargo en gelatinas para transfusión esto no puede ser llevado hasta un extremo tal, como se requeriría, ya que el coloide abandona el ciclo tanto más rápidamente, cuanto menores son las moléculas.
- 30.- Por esto se ha intentado modificar la gelatina químicamen



1974

te de tal forma, que con un peso medio molecular pre-establecido se reduce drásticamente la capacidad de gelatinización (medible por el punto de fusión de gel). En este sentido es conocido, el desintegrar y humectar simultáneamente la gelatina, para lo que

5.- de las moléculas de gelatina lineales se producen moléculas ramificadas o en parte también moléculas intermolecularmente puentesdas. Para lo que el peso medio molecular puede ser mantenido relativamente alto, si bien la longitud media de la cadena libre - (sin ramificar) se reduce. (CH-PS 441 621; DT-PS 1 165 606). Por

10.- ésto se dificulta la retrogradación de la conformación helicoidal típica de los colágenos y gelatinas, que es condición previa para la gelatinización.

A la presente invención de plantas como base el cometido, de obtener por medios muy distintos, a saber, sin la incorporación de moléculas extrañas, como son los reactivos humectadores,

15.- una gelatina modificada con un punto de fusión de gel, que con respecto al correspondiente de una gelatina convencional se encuentra notablemente más bajo con igual peso medio molecular.

El objeto de la invención es una gelatina modificada con

20.- un punto de fusión de gel rebajado y un peso medio molecular de como mínimo aproximadamente 20.000, caracterizada, porque como mínimo se encuentra presente en la forma "D" el 6% de la suma de los restos aminoácidos de la alanina, isoleucina, leucina, serina y - prolina ópticamente activos contenidos en la gelatina.

En los colágenos negativos todos los restos aminoácidos se presentan en la configuración "L". En las gelatinas comerciales usuales, que son obtenidas por la ebullición de colágenos previamente tratados con cal o ácido, únicamente resulta posible comprobar restos aminoácidos "D" en forma de trazos. Se comprobó que la

25.- gelatina conforme a la invención, en la que se encuentran contenidos

30.-



1974

- restos aminoácidos parcialmente en forma "D", presenta un punto de fusión de gel notablemente más bajo que una correspondiente-gelatina nativa, en la que los restos aminoácidos prácticamente se presentan exclusivamente en la configuración "L", aún cuando
- 5.- la gelatina conforme a la invención tiene la misma longitud de cadena o una longitud de cadena tan solo poco inferior, a la correspondiente gelatina nativa. Conforme a la presente invención se obtiene por consiguiente una gelatina sin humectar con un peso molecular relativamente alto y un punto de fusión de gel bajo. -
- 10.- La reducción del punto de fusión de gel es tanto mayor, cuanto mayor es la proporción de los restos aminoácidos en forma "D" presentes en la gelatina. La gelatina conforme a la invención se produce, porque como mínimo el 6% de la suma de los restos aminoácidos de la alanina, isoleucina, leucina, serina y prolina ópticamente activos contenidos en la gelatina se transforman a la forma "D". La transformación de los restos aminoácidos ópticamente activos a la forma "D" se logra preferentemente, calentando la gelatina con un valor pH de como mínimo 10,5, preferentemente de 11 a -
- 15.- 11,5, medido a 90° C, a temperaturas de 90 a 160° C, preferentemente de 130 a 160° C, hasta alcanzar el grado de racemización deseado, interrumpiendo a continuación rápidamente la reacción por la reducción del valor pH y/o reducción de la temperatura y eliminando eventualmente las sales inorgánicas de la solución obteniéndose la gelatina modificada. El grado de racemización deseado depende de la utilización a que se destine la gelatina. La gelatina con un peso molecular de aproximadamente 20.000 posee ya un punto de fusión de gel próximo a los 0°, cuando únicamente se presenta aproximadamente el 6% de la suma de los restos aminoácidos ópticamente activos de la alanina, isoleucina, leucina, serina, y prolina en la
- 20.- forma "D", contenidos en la gelatina y se trata de una solución -
- 25.-
- 30.-



1974

acuosa aproximadamente al 4% en peso de la gelatina.

Si se producen soluciones con igual concentración de una gelatina con un peso molecular medio más elevado y que hayan de presentar un punto de fusión de gel próximo a 0° C, la proporción de los

- 5.- restos aminoácidos presentes en la forma "D" deberá ser respectivamente más elevadas, preferentemente como mínimo del 8% y de forma especialmente preferente como mínimo del 10%.

Como sustitutivo para el plasma sanguíneo sirven preferentemente soluciones acuosas con una concentración del 3 al 6% en

- 10.- peso, preferentemente del 3,5 al 4,5% en peso de gelatina. A este fin se utilizará preferentemente una gelatina conforme a la invención con un peso medio molecular de como mínimo aproximadamente 20.000, preferentemente de 25.000 a 30.000, o en algunos casos superior a 30.000 hasta aproximadamente 60.000. En una gelatina tal

- 15.- conforme a la invención se presentan en la forma "D" aproximadamente del 10 al 12% de los restos aminoácidos de la alanina, isoleucina, leucina, serina y prolina ópticamente activos contenidos en ésta. Si se desea una gelatina conforme a la invención, cuyo peso molecular se encuentre aún más alto, y que haya de presentar dentro

- 20.- de una solución acuosa del 4% en peso aproximadamente un punto de fusión de gel de aproximadamente 0° C, la proporción de los restos aminoácidos citados, que se presentan en la forma "D", deberá elevarse preferentemente como mínimo al 12%. Pueden presentarse en la forma "D" más del 25% y hasta el 50% y más.

- 25.- El punto de fusión de gel se determina según el método de O. Gerngross (Z. química aplicada 42, 971 (1929), modificado según H.R. Stoll (Diss. Berna, 1967).

El peso medio molecular (M_n), se determina osmométricamente según Hs. Nitschmann et al., Vox sang. 12, 106 (1967).

- 30.- Como material de partida para la producción de la gelati



- na conforme a la invención entran en consideración preferentemen-
te las gelatinas comerciales procedentes de mamíferos, por ejemplo
las gelatinas a base de huesos o piel de ganado vacuno así como de
huesos o piel de cerdo. También pueden utilizarse las gelatinas ob-
tenidas de piel de pescado. Como durante la producción de la gela-
tina conforme a la invención se produce una cierta reducción del -
peso molecular por hidrólisis, la gelatina aplicada como material
de partida ha de poseer un peso molecular respectivamente más alto
al deseado para la gelatina conforme a la invención.
- 5.-
- 10.- Con el fin de favorecer la racemización con respecto a -
la desintegración hidrolítica en el medio alcalino, se ha demostra-
do la conveniencia de establecer en la solución acuosa de gelatina
un elevado valor pH por la adición de una base fuerte y a continua-
ción calentarla durante un corto período de tiempo a temperaturas
relativamente altas (80-160° C). Como la duración del calentamien-
to ejerce una mayor influencia sobre una desintegración elevada de
la gelatina que la temperatura de calentamiento, se prefiere esco-
ger la temperatura relativamente alta y mantener el tiempo de calen-
tamiento lo más corto posible. La duración del calentamiento, que
se requiere para obtener un grado de racemización deseado, es tan-
to menor, cuanto mayor la temperatura aplicada. La racemización de-
seada se alcanza por regla general aplicando las temperaturas ante-
riormente indicadas, cuando por ejemplo se procede al calentamien-
to durante un período de tiempo de 10 segundos a 5 minutos. El - -
tiempo de calentamiento requerido bajo consideración del grado de
racemización deseado y de la temperatura aplicada así como del va-
lor pH utilizado puede ser determinada para el caso concreto me-
diante un ensayo previo. En cualquier caso - como ya se ha expues-
to - resulta deseable, mantener el tiempo de calentamiento lo más
corto posible, la temperatura aplicada y el valor pH lo más eleva-
- 15.-
- 20.-
- 25.-
- 30.-



dos, posible, para lo que el límite superior se encuentra dado -
por la evitación de una descomposición indeseada respectivamente
una desintegración indeseada de la gelatina. La interrupción de -
la reacción puede tener lugar por la neutralización por la adición
5.- de ácido y el enfriamiento simultáneo o sucesivo o por medio de -
un enfriamiento muy rápido y consiguiente neutralización. También
se puede trabajar sin agua en un disolvente no acuoso como por e-
jemplo dimetilsulfóxido, para lo que se utilizan preferentemente -
bases como por ejemplo butanolato terciario de sodio, que por razo-
10.- nes estéricas en lo posible no pueden atacar el enlace péptido.

El calentamiento momentáneo de las soluciones de gelati-
na acuosas hechas altamente alcalinas puede ser llevado a cabo por
el denominado método de Batch, para lo que se ha de procurar espe-
cialmente con volúmenes elevados la posibilidad de un rápido calen-
15.- tamiento y enfriamiento sucesivo. Aun cuando también se puede tra-
bajar de forma continua como por ejemplo por el procedimiento con-
tinuo, con el que resulta más fácil mantener estrictamente los lí-
mites de tiempo para el calentamiento momentáneo de las soluciones
alcalinas. Los aparatos como los utilizados por ejemplo en la in-
20.- dustria de la alimentación para la uperización son adecuados para
estas formas de trabajo.

Sobre si se ha producido racemización y hasta qué límite,
puede determinarse mediante los métodos de por sí conocidos del aná-
lisis cuantitativo de los aminoácidos de los preparados de la gela-
25.- tina. Así por ejemplo los grados de racemización en los preparados
pueden ser comprobados por ejemplo por el método de la cromatogra-
fía de gases según W. Parr et al. (J. Cromatogr. Sci. 9 141 (1971)).

Como es natural estas gelatinas desintegradas bajo racemi-
zación pueden ser modificadas químicamente con ulterioridad (por e-
30.- jemplo succinilizadas o humectadas en covalencia) a saber, con man



1975

- tenimiento del grado de racemización y su efecto disminuidor de la capacidad de gelatinización. Una modificación química similar (por ejemplo una acilación) puede ser llevada a cabo en caso necesario simultáneamente con la desintegración racemizadora altamente alcalina. También resulta posible proceder a la racemización por un medio altamente alcalino en la forma descrita en gelatinas previamente modificadas químicamente (por ejemplo aciladas).
- 5.-
- Dependiendo de los fines de aplicación de la gelatina parcialmente racemizada habrá de eliminarse de los preparados el contenido de sal relativamente elevado resultante tras la neutralización. La depuración de las gelatinas conforme a la invención puede tener lugar en forma de por sí conocida por ejemplo por dialisis mediante resinas intercambiadoras de iones o por precipitación. Para la utilización como líquido sustitutivo de la sangre puede resultar precisa la adición de pequeños volúmenes de sales inorgánicas, como ya es sabido por el experto. Las soluciones terminadas pueden ser esterilizadas y envasadas en botellas. Estas soluciones tienen una duración prolongada. No obstante también resulta posible producir a partir de las soluciones por procedimientos de secado conocidos, por ejemplo por liofilización, secado por rociado, etc. Las gelatinas conforme a la invención como preparado seco, que en un determinado momento ulterior puede volver a ser disuelto.
- 10.-
- 15.-
- 20.-

La invención se explica detalladamente por medio de los ejemplos.

25.- Ejemplo 1

- 428 g de gelatina de huesos o gelatina de piel del tipo comercial con N aproximadamente 45.000 se disuelven en 4,57 l de agua destilada y calientan a 90° C. A continuación se adicionan de una vez 142 ml de NaOH 5 n agitando intensamente. Por lo que el pH se eleva de 10,5 a 11,5. Al cabo de 2,5 minutos exactamente
- 30.-



se adicionan 110 ml de HCl 5 n, por lo que el pH disminuye a 7,5-8,0. A 90° C se adicionan agitando 93 g de ácido succínico anhídrido. Al cabo de 5 minutos el valor pH se ajusta a 7,0 y se calienta la solución a 120° C durante 20 minutos en un recipiente cerrado.

- 5.- Tras el enfriamiento a aproximadamente 60° C se desaliniza totalmente la solución en el Dowex 50 W y 21 K (o por ósmosis inversa, o por dialisis) y se diluye a un contenido de gelatina del 4,2%. A continuación se establece un contenido salino fisiológico (0,9% NaCl, o Lactato Ringer) y se elva el pH a 7,1. Tras la filtración de gérmenes puede envasarse la solución en botellas y ser esterilizada por calentamiento durante 20 minutos a 120° C.
- 10.-

La gelatina tiene un M_n de 23.000. El punto de fusión de gel de la solución al 4% subenfriada es de 0° C. La viscosidad reducida (η_{rel} / c) de la solución a 37° C es de 0,24 (η_{rel} medida con una concentración de la gelatina del 1% y 0,9% de NaCl).

- 15.- La alanina se presenta en el 5,4% en forma "D", isoleucina en el 45,8% leucina en el 8,7%, serina en 32,4% y prolina en el 7,0%. Caso de preferirse la forma seca, se somete la solución directamente tras la filtración de gérmenes a uno de los procedimientos de secado conocidos (secado por liofilización, secado por rociado). El producto seco puede ser disuelto en agua destilada, envasado en botellas y ser esterilizado por calentamiento durante 20 minutos a 120°C.
- 20.-

Ejemplo 2

- 25.- Una solución de gelatina de igual concentración que en el Ejemplo 1 es bombeada de forma continua bajo adición continua de 28,6 ml de NaOH 5 n/litro a través de una instalación de uperiación, en la que es calentada durante 30-60 segundos a 140-150° C. Inmediatamente a continuación la solución es enfriada por expansión a aproximadamente 50° y neutralizada por la adición continua de - -
- 30.- HCl 5 n.

La solución saliente es totalmente desalinizada en el Dowex 50 W y 21 E (o por ósmosis inversa) diluida a un contenido de gelatina del 4,2% y mezclada con volúmenes de sal fisiológica (0,9% NaCl o lactato Ringor). Trás establecer el pH en 7,1 se filtran los gérmenes, envasa en botellas y es esterilizada por calentamiento durante 20 minutos a 120° C.

Datos de medida: M = 25.000; punto de fusión de gel = 2-3° C, viscosidad reducida (n_{rel}/c) = 0,27. La alanina se establece en el 9,0% en forma "D", isoleucina en el 44%, leucina en el 9,8%, serina en el 46,3% y prolina en el 6,0%.

La presente solicitud que corresponde a la Patente depositada en Alemania bajo el nº P 23 48 294.2 de fecha 26 de Septiembre de 1.973, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

NOTA

Se declara como de propiedad y novedad para todo el territorio español el contenido de las siguientes:

REIVINDICACIONES

1ª.- Procedimiento para preparar gelatina modificada con punto de fusión de gel rebajado, y un peso molecular medio de como mínimo aproximadamente 20.000 de acuerdo con cuyo procedimiento se procede a la transformación, como mínimo el 6% de la suma de los restos aminoácidos de la alanina, isoleucina, leucina, serina y prolina ópticamente activos contenidos en la gelatina, a la forma "D".

2ª.- Procedimiento para preparar gelatina modificada con punto de fusión de gel rebajado, conforme a la reivindicación 1ª, caracterizado, porque la gelatina con un valor

pH de como mínimo 10,5, preferentemente de 11 a 11,5 medido a 90° C, es calentada a temperaturas de 90 a 160° C, preferentemente de 130 a 160° C, hasta alcanzar el grado de racemización deseado, siendo a continuación rápidamente interrumpida

5.- la reacción por reducción del valor pH y/o reducción de la temperatura y las sales inorgánicas eventualmente eliminadas de la solución y obtenida la gelatina modificada.

10.- 3.- Procedimiento para preparar gelatina modificada con punto de fusión de gel rebajado, conforme a la reivindicación 2ª, caracterizado, porque el calentamiento se lleva a cabo durante un período de tiempo de 10 segundos a 5 minutos.

15.- 4.- Procedimiento para preparar gelatina modificada con punto de fusión de gel rebajado, conforme a una de las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado, porque el procedimiento es desarrollado de forma continua.

20.- 5.- Procedimiento para preparar gelatina modificada con punto de fusión de gel rebajado, conforme a una de las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado, porque la gelatina químicamente modificada principalmente acilada, preferentemente succinilizada es aplicada como producto de partida.

25.- 6.- Procedimiento para preparar gelatina modificada con punto de fusión de gel rebajado, conforme a una de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado, porque la gelatina es transformada durante el calentamiento con un medio modificador químico, principalmente acilada, preferentemente succinilizada.

30.- 7.- Procedimiento para preparar gelatina modificada con punto de fusión de gel rebajado, conforme a una de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado, porque la gelatina -

trás el calentamiento es transformada con medios modificadores químicos, principalmente acilada, preferentemente succinilizada.

88.- "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR GELATINA MODIFICADA CON PUNTO DE FUSION DE GEL REBAJADO.-"

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de DOCE hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 23 de Septiembre de 1.974

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. L. L. L.', with a large flourish at the end.