

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial

IN.-



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

6 NOV 1978

10 ES	11 NUMERO	12 A1
21	461.916	
22	FECHA DE PRESENTACION	
	26-8-1.977	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
101.633/1976	27-8-1.976	Japón

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07 F // C07 H	

54 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DIHIDRATO DE GUANOSIN-5'-DIFOSFATO MONOSODICO CRISTALINO.

71 SOLICITANTE (S)

YAMASA SHOYU KABUSHIKI KAISHA

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

550, Araci 2-chome, Choshi-Shi, Chiba-Ken - Japón

72 INVENTOR (ES)

Masao Kumagai; Seishiro Yonei y Hiroshi Yoshino, todos de nacionalidad japonesa, los cuales han cedido sus derechos a la entidad solicitante.

73 TITULAR (ES)

El mismo solicitante

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 La presente invención se refiere a nuevos cris-
tales de dihidrato de guanosin-5'-difosfato monosódico (al
que en adelante se le llamará GDP.Na.2H₂O por razones de
brevedad) y a un procedimiento para obtención de los mismos.
5 La presente invención se refiere a la obtención muy eficaz de
cristales de sal sódica de guanosin-5'-difosfato (al que en
adelante se llamará GDP por razones de brevedad) que son muy
puros y estables durante un largo periodo de tiempo.

10 Ya es conocido que el GDP es un miembro del gru-
po de coenzimas de nucleótidos y toma parte en una reacción
de transfosforilación en un cuerpo vivo. Recientemente ha
habido un incremento gradual en la demanda de GDP como agen-
te médico y bioquímico. En cuanto a la preparación del GDP,
éste puede obtenerse a partir de diversos tejidos de un cuer-
15 po vivo por un método de extracción. También se puede obte-
ner industrialmente a partir de ácido 5'-guanílico por méto-
do sintético. Sin embargo, como el GDP es menos soluble que
otros esteres de ácido pirofosfórico de nucleótidos, es di-
fícil de cristalizar, y por esta razón no había sido obteni-
do aún un GDP cristalizado. Según esto, el GDP ha sido obte-
nido hasta ahora como un producto amorfo, pulverulento por
secado de una solución de la sal trisódica, sal disódica, sal
trilítica o sal dilítica del GDP, por ejemplo, por un método
de secado por congelación. Sin embargo, estos productos amor-
25 fos, pulverulentos no solamente contienen diversas impurezas,
sino que también son todos ellos inestables y se hidrolizan
facilmente en ácido 5'-guanílico. Por tanto, estos productos
no pueden almacenarse a la temperatura ambiente y deben al-
macenarse a temperaturas bajas.

30 En vista de estas dificultades, los solicitantes

1 han hecho varios intentos para obtener cristales de sal sódica de GDP de elevada pureza y estabilidad. Como resultado, han descubierto que el GDP está presente en una solución que contiene una sal sódica de GDP como sal monosódica del mismo, lo que era absolutamente desconocido hasta ahora, en un intervalo de pH bajo, esto es de 1,0 a 3,0 que se consideraba como un intervalo peligroso dentro del cual se descomponía el GDP. Los solicitantes han encontrado que la sal monosódica del GDP (a la que en adelante se llamará GDP.Na) puede cristalizar fácilmente debido a que la solubilidad de la misma aumenta notablemente en este estado. Además han confirmado que el cristal resultante es un dihidrato que es de elevada pureza y muy estable. Esta invención se basa en estos hallazgos.

15 Según esta invención, en uno de sus aspectos, resumido brevemente, se proporciona un nuevo dihidrato de guanosin-5'-difosfato monosódico, en la forma de cristales aciculares, caracterizados por un específico espaciado de la red en la difracción con rayos X como se señala en la Tabla 2 dada a continuación.

20 Según esta invención en otro de los aspectos de la misma, resumido brevemente, se proporciona un procedimiento para producir el dihidrato de guanosin-5'-difosfato monosódico señalado antes, en forma de cristales, que comprende el ajuste del pH de una solución acuosa de sal sódica de GDP a un nivel de 1,0 a 3,0, preferiblemente 1,5 a 2,5 y reducir después la solubilidad de GDP.Na en la solución con lo que cristaliza el GDP.Na.2H₂O.

25 La naturaleza, utilidad y otras características de esta invención se deducirán de la siguiente memoria des-

30

1 criptiva que comienza con una consideración de los aspectos
y características generales de la invención y concluye con
ejemplos específicos de la práctica.

En las ilustraciones:-

5 La FIG. 1 es un gráfico de muestra de difrac-
ción de rayos X de un cristal de GDP.Na.2H₂O de la presente
invención; y

Los GRAFICOS A y B son fotomicrografías respecti-
vamente de cristales de GDP.Na.2H₂O de la presente invención
y un producto amorfo pulverulento convencional de GDP.2Na.

10 La sal de sodio del GDP utilizada en la presente
invención puede prepararse por cualquier método adecuado tal
como extracción o síntesis. Para propósitos industriales, se
emplea una sal sódica de GDP obtenida por un método sintéti-
co. Entre los ejemplos de tal método sintético están el mé-
todo de morfolidato que comprende la adición de una solución
de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) en t-butilalcohol gota a
gota a una solución de 5'-guanílico y morfolina en una mezcla
de agua y t-butilalcohol para producir guanosin-5'-fosforo-
morfolidato, y la reacción en piridina anhidra del guanosin-
5'-fosforomorfolidato con fosfato de tributilamonio para pro-
ducir GDP (Véase J.G. Moffatt, H.G. Khorara, J. Amer. Chem.
Soc. 83 649 (1961)) y un método de intercambio aniónico que
comprende la reacción de ácido 5'-guanílico con difenil fos-
forocloridato y tri-n-butilamina en un medio de dimetilfor-
mamida y reacción de la p¹-guanosin-5'p²-difenilpirofosfato
resultante con fosfato de tributilamonio en piridina para
formar GDP (véase A.M. Michelson, Biochim. Biophys. Acta, 91,
25 (1964) p.p.1 - 13).

30 En la presente invención se utiliza una solu-

1 ción acuosa de una sal sódica de GDP preparada a partir de
la solución sintética así obtenida o la solución parcialmen-
te purificada de la misma preparada por cualquier método ade-
5 cuado. El término "sal sódica de GDP" tal como aquí se em-
plea se refiere a cualquier sal de sodio del GDP en general
incluyendo la sal monosódica, sal disódica y sal trisódica
del GDP. También el término "solución acuosa" como se usa
aquí se refiere a una solución en agua o en una mezcla de
10 agua y cualquier disolvente orgánico hidrófilo o sluble en
agua utilizable en cristalización. El término "disolvente
orgánico hidrófilo" se emplea aquí para indicar un disolven-
te orgánico para el cual el $\text{GDP.Na.2H}_2\text{O}$ es poco soluble y el
cual es soluble en agua lo suficiente para formar un medio
acuoso del cual cristalice el $\text{GDP.Na.2H}_2\text{O}$ disuelto en él.
15 Entre los ejemplos de los disolventes orgánicos hidrófilos
utilizados en cristalización están los alcoholes inferiores
mono-, di-, tri- o tetrahidroxílicos de 1 a 4 átomos de car-
bono aproximadamente, especialmente alcoholes mono- o dihi-
droxílicos tales como metanol, etanol, etilenglicol, propi-
20 lenglicol y metilcelosolve que es el eter monometílico del
etilenglicol; cetonas de 3 a aproximadamente 5 átomos de car-
bono en total tales como acetona, metiletilcetona; éteres
de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 átomos de carbono
en total tales como dietiléter, tetrahidrofurano y dioxano;
25 y mezclas de dos o más de estos disolventes. Etanol, dioxano
y metanol son los preferidos.

Es necesario ajustar el pH de una solución
acuosa de una sal sódica de GDP a un nivel de 1,0 a 3,0,
preferiblemente 1,5 a 2,5, para obtener cristales de GDP.
30 $\text{Na.2H}_2\text{O}$ de la presente invención. A un pH más bajo de 1,0,

1 existe la posibilidad de descomposición del GDP. Por otra
parte a un pH por encima de 3,0, los cristales de $\text{GDP.Na.2H}_2\text{O}$
no se pueden obtener y se forma un precipitado amorfo de sal
disódica de la GDP.

5 El método de ajuste del pH no está particular-
mente limitado. Ordinariamente, para este propósito se utili-
za un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido sul-
fúrico o ácido nítrico o una resina de intercambio catióni-
co. Se prefiere el empleo de ácido clorhídrico.

10 La concentración de la solución acuosa de la
sal de sodio del GDP no queda limitada particularmente. Se
prefiere una concentración que varía de 5 a 20% para obtener
con una elevada eficacia, un cristal de $\text{GDP.Na.2H}_2\text{O}$ de pure-
za elevada y buena calidad. Cuando la concentración es me-
15 nor de un 5%, el producto resultante, aunque contiene cris-
tales aciculares, está totalmente gelificado y la separación
de cristales es difícil. Por otra parte en el caso en que la
concentración sea más de 20%, el producto resultante tiene
un buen estado cristalizado, pero está inevitablemente con-
20 taminado con impurezas, y es difícil obtener cristales de
pureza elevada.

25 La cristalización se lleva a cabo a una tempe-
ratura más elevada que la temperatura de congelación de la
solución y no superior a 30°C, preferiblemente o a 20°C. Las
temperaturas por encima de 30°C pueden causar la descomposi-
ción del GDP y evitar una producción eficaz de cristales.

30 La manera en que el $\text{GDP.Na.2H}_2\text{O}$ cristaliza de
una solución acuosa que contiene GDP.Na en las condiciones
antes mencionadas no queda limitada en forma particular. Se
pueda emplear cualquier método en el que se reduzca la solu-

1 bilidad del GDP.Na en la solución acuosa para que precipite
el GDP.Na.2H₂O en forma de cristales. Como representativo
de un método tal está el que comprende la adición gota a go-
ta de los disolventes orgánicos hidrófilos mencionados antes
5 a una solución acuosa de una sal sódica de GDP en las condi-
ciones mencionadas antes hasta que la solución empieza a en-
turbarse dejando reposar la mezcla resultante hasta que el
GDP.Na.2H₂O empieza a cristalizar, y después la adición de
disolventes orgánicos hidrófilos a la mezcla para efectuar
10 una cristalización completa del GDP.Na.2H₂O cuando los cris-
tales empiezan a formarse.

Otro método comprende la concentración de una
solución acuosa de una sal sódica del GDP al deseado nivel
de concentración y dejar la solución así concentrada en un
15 lugar frío con lo que precipitan los cristales de GDP.Na.2H₂O.
Aún otro método comprende la disolución de una sal sódica de
GDP en una mezcla de agua y un disolvente orgánico hidrófilo
y enfriar la solución resultante para precipitar los crista-
les de GDP.Na.2H₂O. Otro método comprende dejar una solución
20 acuosa de una sal sódica de GDP en un lugar frío durante un
largo periodo de tiempo sin concentrar la solución, y otro
método comprende la destilación del agua de una solución de
una sal sódica de GDP en agua o una solución de una sal só-
dica de GDP en agua y en un disolvente orgánico hidrófilo que
25 tiene un punto de ebullición superior al del agua. Cualquiera
combinación de estos métodos es aplicable a la presente in-
vención. Cuando se añade un cristal de siembra a la crista-
lización del GDP.Na.2H₂O, se obtienen eficazmente cristales
de GDP.Na.2H₂O con buen hábito cristalino.

30 De esta forma se obtienen los nuevos cristales

1 de GDP.Na.2H₂O de la presente invención con la forma cristalina y las propiedades físicas y químicas siguientes:

(1) Forma cristalina: cristales aciculares

5 (2) Análisis cuantitativo de sodio: Este análisis se lleva a cabo según el análisis de absorción atómica en comparación con el polvo amorfo de la sal disódica del GDP (GDP.2Na) obtenido por el método convencional. Los resultados se dan en la Tabla 1.

10 Tabla 1

	Contenido en sodio (%)	
	Teórico	Experimental
15 GDP.Na.2H ₂ O según esta invención	4,945	5,021
GDP.2Na polvo amorfo según el método convencional	9,444	9,61

20 Como puede verse de la Tabla 1, el contenido de sodio de los cristales de la presente invención concuerdan bien con el valor teórico como sal monosódica de GDP.

25 (3) Análisis del agua de cristalización: Cuando el cristal de la presente invención se seca bajo vacío, en presencia de gel de sílice, se alcanza el equilibrio después de 48 horas. El contenido en agua de los cristales resultantes se determina según el método de Karl Fischer para determinar el contenido en agua de cristalización de los mismos.
30 Se encuentra que éste es de 7,23% que concuerda

1

bien con el valor teórico de 7,18% como dihidrato de GDP.Na.

5

(4) Difracción de rayos X: El espaciado de la red con la difracción de rayos X se muestra en la Tabla 2 (véase Fig. 1).

Tabla 2

	d (Å)	Intensidad relativa	d (Å)	Intensidad relativa	d (Å)	Intensidad relativa
10	20.060	I	3.948	S.W	2.761	V.W
	11.930	I	3.798	W	2.688	V.W
	10.270	S.W	3.735	M	2.590	V.W
	7.824	W	3.630	S.W	2.547	V.W
	6.602	W	3.573	M	2.493	V.W
15	5.980	W	3.312	M	2.440	V.W
	5.749	M	3.218	I	2.409	V.W
	5.211	V.I	3.076	W	2.348	V.W
	4.844	V.I.	3.035	M	2.236	V.W
	4.572	W	2.976	S.W	2.189	V.W
20	4.458	S.W	2.928	S.W	2.154	V.W
	4.247	M	2.891	V.W	2.061	V.W
	4.207	M	2.855	V.W	1.971	V.W
	4.001	V.W	2.820	V.W		

25

V.W : muy débil
 W : débil
 S.W : algo débil
 M : mediana
 I : intensa
 V.I : muy intensa

30

Tabla 3

Horas transcurridas	Residuo GDP (%)	
	Cristales de esta invención	Polvo amorfo de GDP 2Na
0	100	100
1	100	95,3
2	100	91,2
3	100	84,4
4	100	80,5
5	100	78,4
6	100	74,8

Se deduce de la Tabla 3 que los cristales de la presente invención no se descomponen en absoluto ni incluso bajo condiciones severas de temperatura como 50°C.

Como se ha mencionado antes se ha podido lograr con esta invención la producción de una sal sódica de GDP cristalina. El GDP.Na.H₂O cristalino obtenido según la presente invención es más estable y puro que el producto de GDP.2Na pulverulento amorfo convencional, de manera que es fácil de almacenar, transportar y utilizar, con lo que se alcanza una ampliación notable de la utilización del GDP.

Para indicar más completamente la naturaleza y utilidad de esta invención, se dan los siguientes ejemplos específicos de la práctica, entendiéndose que estos ejemplos se presentan solamente como ilustrativos y no como limitativos del marco de la invención.

Ejemplo 1

A 500 ml. de una solución acuosa que contiene sal

1 sódica de GDP en una cantidad correspondiente a 10 g calcula-
do en términos de sal monosódica de GDP se le ajusta el pH
a 1,8 con ácido clorhídrico 6N y se reduce su volumen a un vo-
lumen de 100 ml. Se añaden entonces 50 ml de etanol gota a go-
5 ta a la solución condensada, agitando al mismo tiempo y, des-
pues de esto se deja reposar la solución durante la noche con
lo que cristaliza en forma de cristales aciculares.

Se añaden después 250 ml de etanol a la solución
resultante, que se deja a continuación durante aproximadamen-
10 te 2 horas con agitación para permitir el crecimiento de los
cristales. Se filtra la solución resultante para separar los
cristales de la solución y se secan los cristales obteniéndose
se 11,3 g de GDP.Na.2H₂O cristalino. Estos cristales tienen
un 100% de pureza y un contenido en agua de 12,3% y son esta-
15 bles a una temperatura de 30°C durante un año.

Ejemplo 2

A 80 ml de una solución acuosa que contiene una
sal sódica de GDP en una cantidad correspondiente a 10 g cal-
culados en términos de sal monosódica de GDP se ajusta el pH
20 a 1,5 con ácido clorhídrico 6N, y la solución resultante se
deja estar a una temperatura de 0°C durante la noche para que
precipiten cristales aciculares de GDP.Na.2H₂O.

Se añaden gradualmente 150 ml de dioxano a la
solución resultante y se agita la mezcla de soluciones para
25 ampliar la cristalización de los cristales. La solución resul-
tante se filtra para separar los cristales de la solución,
y los cristales se secan obteniéndose 10,5 g de GDP.Na.2H₂O.
Los cristales tienen una pureza de 99,7%.

Ejemplo 3

30 Se disuelven 15 g de polvos amorfos de GDP.2Na

1 en 100 ml de agua y se ajusta el pH de la solución resultante
a 1,5 con clorhídrico 6N. Se añade un disolvente mixto
consistente en dioxano y metanol en una relación de 2:1 a la
solución anterior hasta turbidez blanquecina de la solución,
5 y se agita la solución resultante a una temperatura de 20°C
durante aproximadamente 1 hora para que precipiten los cris-
tales aciculares de GDP.Na.2H₂O.

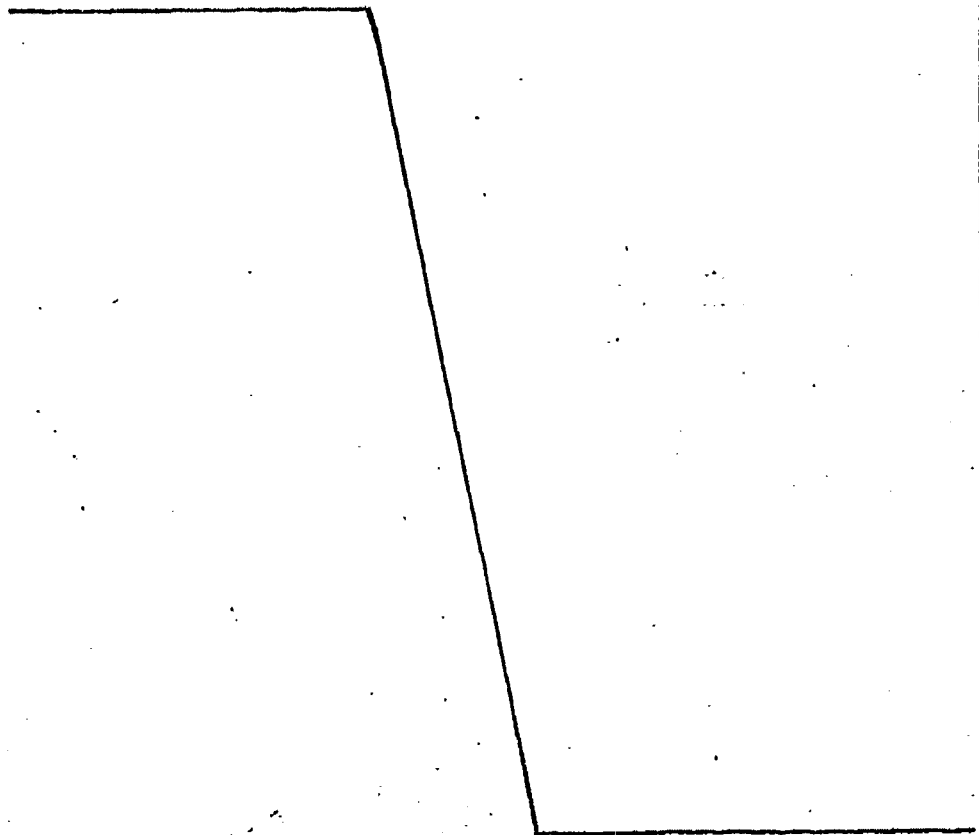
10 Se añade además una cantidad doble del disolven-
te mixto antes mencionado a la solución resultante, y se deja
reposar la solución a la temperatura de 3°C durante toda la
noche para que precipiten los cristales por completo. La so-
lución así tratada se filtra para separar cristales de la so-
lución, y los cristales se secan obteniéndose 17,2 g de
GDP.Na.2H₂O. El producto tiene una pureza de 100,8%.

15

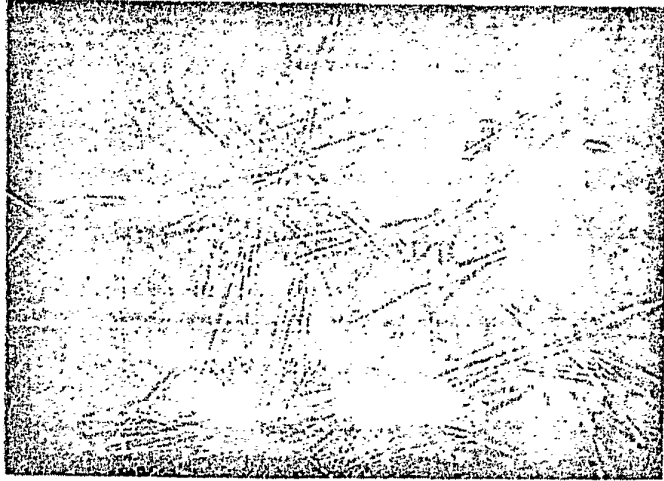
20

25

30



EJEMPLO GRAFICO A



EJEMPLO GRAFICO B



1 En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

- REIVINDICACIONES -

5 1. Un procedimiento para la preparación de dihidrato de guanosa-5'-difosfato monosódico cristalino, que comprende:

10 a) preparar una solución acuosa de ácido guanosa-5'-difosfórico o una sal sódica del mismo, cuya solución acuosa se obtiene como tal o se produce disolviendo una sal sódica del ácido guanosa-5'-difosfórico en agua - que puede contener opcionalmente un disolvente hidrofílico;

15 b) ajustar el valor del pH de la solución al rango de 1,0 a 3,0 por adición a la misma de un material ácido o un material alcalino sódico o sin adicionar nada para obtener una solución acuosa de guanosa-5'-difosfato monosódico a pH 1,0 - 3,0; y

20 c) reducir la solubilidad del guanosa-5'-difosfato monosódico contenido en dicha solución para precipitar el dihidrato de guanosa-5'-difosfato monosódico, llevando a cabo esta etapa a una temperatura no superior a 30° C.

25 2. Un procedimiento, según la reivindicación 1, donde la etapa c) comprende la adición de un disolvente orgánico hidrófilo en el cual es poco soluble el guanosa-5'-difosfato monosódico a la solución acuosa de una sal sódica del ácido guanosa-5'-difosfórico a un pH de 1,0 a 3,0 para reducir la solubilidad del guanosa-5'-difosfato monosódico disuelto allí con lo que precipita el dihidrato de guanosa-5'-difosfato monosódico.

30 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, donde el disolvente orgánico hidrófilo es un alcohol se-

1 leccionado del grupo que consiste en alcoholes monohidroxí-
lico y dihidroxílico ambos con 1 a 4 átomos de carbono, y -
mezclas de los mismos.

5 4. Un procedimiento, según la reivindica-
ción 3, donde el alcohol se selecciona del grupo que consis-
te en metanol, etanol, etilenglicol, propilenglicol, metil-
cellosolve y mezclas de los mismos.

10 5. Un procedimiento, según la reivindicación
2, donde el disolvente orgánico hidrófilo es un éter de 4 a
6 átomos de carbono en total.

6. Un procedimiento, según la reivindicación
5, donde el éter se selecciona del grupo que consiste en -
dietileter, tetrahidrofurano y dioxano.

15 7. Un procedimiento, según la reivindica-
ción 2, donde el disolvente orgánico hidrófilo es una ceto-
na de 3 a 5 átomos de carbono en total.

8. Un procedimiento, según la reivindica-
ción 7, donde la cetona se selecciona del grupo que consis-
te en acetona y metiletilcetona.

20 9. Un procedimiento según la reivindica-
ción 1, donde la etapa c) comprende concentrar la solución
acuosa de la sal monosódica de ácido guanosin-5'-difosfóri-
co y dejarla reposar hasta que precipitan los cristales de
dihidrato de guanosin-5'-difosfato monosódico.

25 10. Un procedimiento, según la reivindica-
ción 1, donde la etapa c) comprende concentrar la solución
acuosa de la sal monosódica del ácido guanosin-5'-difosfóri-
co y después añadir a la solución resultante un disolvente
orgánico hidrófilo en el cual es poco soluble el guanosin
30 -5'-difosfato monosódico con lo que precipitan cristales de

1 dihidrato de guanosin-5'-difosfato monosódico.

5 11. Un procedimiento, según la reivindicación 10, donde el disolvente hidrófilo orgánico es un alcohol seleccionado del grupo que consiste en alcoholes monohidroxílicos y dihidroxílicos ambos con 1 a 4 átomos de carbono y mezclas de los mismos.

10 12. Un procedimiento, según la reivindicación 11, donde el alcohol se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, etilenglicol, propilenglicol, metilcellosolve y mezclas de los mismos.

13. Un procedimiento, según la reivindicación 9, donde el disolvente orgánico hidrófilo es un éter de 4 a 6 átomos de carbono en total.

15 14. Un procedimiento, según la reivindicación 13, donde el éter se selecciona del grupo que consiste en dietiléter, tetrahidrofurano y dioxano.

15. Un procedimiento, según la reivindicación 9, donde el disolvente orgánico hidrófilo es una cetona de 3 a 5 átomos de carbono en total.

20 16. Un procedimiento según la reivindicación 15, donde la cetona se selecciona del grupo que consiste en acetona y metiletacetona.

25 17. Un procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16, donde la solución acuosa de la sal monosódica del ácido guanosin-5'-difosfórico se ajusta a una concentración de 5 a 20% para que precipiten los cristales de dihidrato de guanosin-5'-difosfato monosódico.

30 18. Un procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 17, donde se mantiene una

1 temperatura no superior a 30°C durante la cristalización.

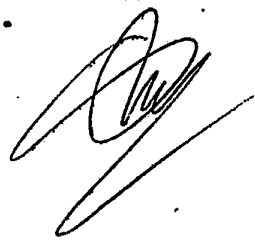
19. Se reivindica por último como objeto -
sobre el que ha de recaer la patente de invención que se so-
licita por: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DIHI-
5 DRATO DE GUANOSIN-5'-DIFOSFATO MONOSODICO CRISTALINO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado
en la presente memoria descriptiva que consta de dieciocho
páginas mecanografiadas.

Madrid, 26 de Agosto de 1.977

BERNARDO UNGRIA

P.P.



10

15

20

25

30