



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 28.05.1975 (P. 180785)

Pierwszeństwo: 30.05.1974 Włochy

Zgłoszenie ogłoszono: 05.06.1976

Opis patentowy opublikowano: 30.12.1977

MKP C07c 103/52

Int. Cl.² C07C 103/52

CZYTELNIA

Urzędu Państwowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Crinos Industria Farmacobiologica S.p.A.,
Villa Guardia (Włochy)

Sposób wytwarzania sulfoglikopeptydów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania sulfoglikopeptydów z glikopeptydów ekstrahowanych z mleka lub kazeiny. Otrzymane sposobem według wynalazku sole amoniowe i metali sulfoglikopeptydów stosuje się do celów terapeutycznych podczas leczenia zmian w stawach i wrzodów żołądka jako środki do gojenia blizn i fibrynolityczne.

Ekstrakcja glikopeptydów z mleka różnych ssaków lub z otrzymanej z mleka kazeiny jest znana i przedstawiona w literaturze. Znany jest również sposób wytwarzania sulfoglikopeptydów z glikopeptydów ekstrahowanych z organów zwierzęcych zwłaszcza ze śluzówki żołądka lub dwunastnicy świń.

Stwierdzono, że sposób wytwarzania znanych sulfoglikopeptydów nie jest efektywny podczas stosowania go do sulfonowania glikoprotein ekstrahowanych z mleka lub kazeiny. Nie można przystosować warunków stosowanych do efektywnego sulfonowania glikoprotein ekstrahowanych z organów zwierzęcych, zwłaszcza śluzówki żołądka czy dwunastnicy świń do procesu sulfonowania glikoprotein ekstrahowanych z mleka lub kazeiny ze względu na różny skład chemiczny tych dwóch rodzajów glikoprotein. Skład chemiczny glikoprotein otrzymanych z mleka lub kazeiny w stosunku do glikoprotein otrzymanych z organów zwierzęcych charakteryzuje się wyższym stosunkiem aminokwasu do węglowodorów oraz wyższą zawartością aminokwasów za-

2

wierających grupę fosforylową i kwasu neuraminowego.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu wytwarzania glikopeptydów ekstrahowanych z mleka lub kazeiny uwzględniającego szczególnie charakterystyczne właściwości tych glikopeptydów.

Sposób sulfonowania glikopeptydów ekstrahowanych z białka lub kazeiny według wynalazku polega na tym, że glikopeptydy ekstrahowane z mleka lub kazeiny rozpuszcza się w aprotycznym, nie aromatycznym rozpuszczalniku mieszającym się z wodą, dodaje trzeciorzędową aminę o temperaturze wrzenia 100—250°C i wytworzony produkt poddaje się sulfonowaniu przez skontaktowanie go ze środkiem sulfonującym, takim jak kwas siarkowy, olej, kwas chlorosulfonowy addukt bezwodnika siarkowego i związku organicznego, przy czym utrzymuje się temperaturę od -20°C do +20°C, a następnie ogrzewa do temperatury 60—90°C i wydziela otrzymany sulfoglikopeptyd. Ewentualnie glikopeptyd dodaje się po dodaniu trzeciorzędowej aminy lub środka sulfonującego.

Stwierdzono, że optimum warunków sulfonowania glikopeptydów ekstrahowanych z organów zwierzęcych otrzymuje się po wytworzeniu zawiesiny w środowisku reakcyjnym zawierającym trzeciorzędową zasadę heterocykliczną w taki sposób, że sulfonowanie ma miejsce w fazie heterogenicznej.

W przypadku glikopeptydów ekstrahowanych z mleka lub kazeiny optimum sulfonowania ma

miejsce po rozpuszczeniu glikopeptydów w fazie rozpuszczalnika zawierającej aprotyczny, nie aromatyczny związek mieszający się z wodą i trzeciorzędową zasadą, korzystnie zasadą aromatyczną o temperaturze wrzenia 100–250°C.

Roztwór glikopeptydu wyekstrahowanego z mleka lub kazeiny w warunkach najbardziej odpowiednich do przeprowadzania procesu stanowi mieszaninę z trzeciorzędową zasadą, korzystnie trzeciorzędową zasadą heterocykliczną, taką jak pirydyna, metylopirydyna, dwumetylopirydyna i chinolina oraz aprotycznym, nie aromatycznym rozpuszczalnikiem nie mieszającym się z wodą, takim jak dwumetyloformamid, dwumetylosulfotlenek, sześciometylofosforamid, dwumetyloacetamid itp.

Poszczególne etapy przeprowadzania sposobu według wynalazku opisano szczegółowo poniżej.

Glikopeptyd wyekstrahowany z mleka lub kazeiny najpierw suszy się, a następnie rozpuszcza w aprotycznym nie aromatycznym rozpuszczalniku mieszającym się z wodą takim jak dwumetyloformamid, dwumetylosulfotlenek, sześciometylofosforamid, dwumetyloacetamid itp. Do otrzymanego w ten sposób roztworu dodaje się trzeciorzędową zasadą, korzystnie zasadą aromatyczną o temperaturze wrzenia 100–250°C. Szczególnie korzystnie stosuje się bezwodną pirydynę.

Jako odpowiedni środek sulfonujący stosuje się kwas siarkowy, oleum, kwas chlorosulfonowy i addukty bezwodnika siarkowego ze związkami organicznymi, takimi jak pirydyna, dioksan i trzeciorzędowe aminy, np. trójetyloamina. Jeżeli stosuje się oleum lub kwas chlorosulfonowy można dodawać osobno środek sulfonujący z zasadą heterocykliczną i stosować otrzymany addukt w sulfonowanej mieszaninie reakcyjnej.

Reakcję sulfonowania przeprowadza się przez kontaktowanie mieszaniny rozpuszczalnika zawierającego glikopeptyd ze środkiem sulfonującym w temperaturze –20°C do +20°C, i następnie podwyższenie temperatury do 60–90°C, korzystnie 80°C w ciągu 4–8 godzin, korzystnie 5 godzin.

Po zakończeniu sulfonowania sulfonowany produkt zbiera się przez sączenie i oczyszcza wydzielony z fazy rozpuszczalnika produkt przez dylutację lub obróbkę żywica jonowymienną.

Otrzymane sole glikopeptydów przeprowadza się następnie w sól sodową z wodorotlenkiem sodu i sól sodową wytrąca się przez rozcieńczenie jej wodnego roztworu odpowiednimi rozpuszczalnikami, takimi jak aceton lub metanol.

Taka sama procedura może być stosowana do przeprowadzania sulfoglikopeptydu w sole z innymi metalami alkalicznymi metalami ziem alkalicznych i metalami ciężkimi lub sól amonową.

Sole te można otrzymać z sulfoglikopeptydu pochodzącego z sulfonowanej mieszaniny reakcyjnej przez zobojętnienie wodorotlenkiem metalu alkalicznego, metalu ziem alkalicznych lub amonu jak również z soli sodowej przez podwójną wymianę z solą metalu ziem alkalicznych lub solą metalu ciężkiego. Sole, otrzymane przez zobojętnienie sulfoglikopeptydu wodorotlenkiem metalu, wyosabia się przez obróbkę wodnych roztworów tych soli

substancją wytrącającą, taką jak aceton lub metanol.

Stwierdzono, że szczególnie korzystne rezultaty otrzymuje się wówczas, gdy przed wytrąceniem dodaje się małą ilość (to jest 3–7% wagowych w stosunku do wodorotlenku) octanu lub halogenku tego samego metalu, którego wodorotlenek był użyty do zobojętnienia mieszaniny reakcyjnej. W tym celu najbardziej korzystne są kationy potasu, litu, wapnia, baru, strontu i amonu.

Reakcję podwójnej wymiany pomiędzy solą, sodową sulfoglikopeptydu a solami innych metali przeprowadza się w roztworze wodnym. Anion tej soli korzystnie stanowi anion octanu lub halogenku. Reakcję podwójnej wymiany przeprowadza się przez wstępne perkolowanie wodnego roztworu soli sodowej sulfoglikopeptydu przez kolumnę wypełnioną żywica silnie kationowymienną, którą uprzednio wysala się kationem metalu, którego sól glikopeptydu chce się otrzymać.

Perkolowany roztwór poddaje się działaniu substancji wytrącającej, takiej jak aceton lub metanol, korzystnie po dodaniu małej ilości octanu lub halogenku tego samego metalu, który chce się otrzymać. Szczególnie korzystne są sole sulfoglikopeptydów z następującymi metalami a mianowicie cynku, wapnia, baru, strontu, miedzi, niklu, kobaltu, magnezu, bizmutu, złota i glinu.

W tablicy 1 podano analityczne wartości charakteryzujące sulfoglikopeptyd i sól sodową otrzymaną z niego (najniższe i najwyższe wartości).

Tablica 1

S	5–11%
N	5–9%
P	0,2–0,5%
Heksozaminy	6–9%
Heksozy	9–12%
Proteiny	45–50%
Kwas N-acetyloneuraminowy	5–8%
Lepkość	1,15–1,30 cP
Wartość pH	5,5–7

Sulfonowane glikopeptydy ekstrahowane z kazeiny wykazują nowe właściwości przeciwwrzodowe, przeciwtrawienne i antysekretyczne.

Badania farmakologiczne potwierdziły, że sole sulfoglikopeptydu otrzymane sposobem według wynalazku były nietoksyczne w dawkach 400 mg/kg dojelitowe i 1 g/kg doustnie. Przy stosowaniu doustnym sulfoglikopeptyd w dawkach 40, 64, 102,4 i 163,8 mg/kg powoduje hamowanie stopnia owrzodzenia odpowiednio w 15% (N.S), 46% (PO, 01), 70% i 76%.

Działanie antytrawienne badano in vivo i in vitro. Stosowane stężenie (od 0,5–4 mg/ml) i podawane w dawkach od 40–160 mg/kg były porównywane z innymi sulfonowanymi makrocząsteczkami (Lietti i współpracownicy, Boll. Soc. It. Biol. Sper. 47, 493, 1971).

Działanie antysekretyczne było zauważone przy wydzielaniu kwasu stymulowanym przez histaminę i pentagastrynę.

Poniższe przykłady ilustrują przedmiot wynalazku, nie ograniczając jego zakresu.

Przykład I. Mieszaninę 170 ml dwumetyloformamidu (DMF) i 230 ml pirydyny chłodzi się do temperatury -20°C . Do otrzymanego roztworu dodaje się 60 ml kwasu chlorosulfonowego i utrzymuje w temperaturze nie przekraczającej -15°C . W tych warunkach wytwarza się addukt pirydyna—kwas chlorosulfonowy. Do fazy zawierającej addukt dodaje się 20 g uprzednio osuszonego i zmieszanego glikopeptydu ekstrahowanego z mleka, podczas mieszania w temperaturze 20°C . Po dodaniu, temperaturę podwyższa się do 80°C i mieszaninę reakcyjną utrzymuje się w tej temperaturze w ciągu 3 godz. Po czym mieszaninę pozostawia się do odstania w temperaturze pokojowej w ciągu 2 godzin. Żelowatą masę wyosabia się przez dekantację.

Z wydzielonej masy przez dodanie 150 ml metanolu wytrąca się proszek koloru żółtego, który zbiera się przez sączenie i rozpuszcza w 250 ml wody. Roztwór wodny traktuje się 200 ml żywicy kationow wymiennej (Amberlite[®] JR-120). Po 10 minutach żywicę oddziela się przez sączenie a przesącz traktuje się 200 ml żywicy wymieniającej anionowej (Amberlite[®] IR-410). Żywicę tę po 10 minutach oddziela się również przez sączenie i wartość pH przesączu doprowadza się do 12 za pomocą roztworu wodorotlenku sodu, a następnie do pH 6.5 za pomocą kwasu octowego. Roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 200 ml, następnie traktuje 4 g jodku sodu i rozcieńcza 1,2 objętościami acetonu, przy czym wytrąca się osad. Wytrącony osad przemywa się etanolem aż do zniknięcia jonów jodu, a następnie eterem etylowym i na zakończenie suszy.

Otrzymuje się 19 g proszku koloru kości słoniowej o następującym składzie:

Wilgotność = 4,9%
S = 8,35%
N = 7,05%
P = 0,3%
Heksozaminy = 7,71%
Heksozy = 11,6%
Proteiny = 46,44%
Kwas N-acetyloneuraminowy = 5,9%
Lepkość = 1,237 cP
Wartość pH = 5,8 (1% w 0,5% NaCl)
Na = 6%

Przykład II. Mieszaninę 180 ml DMF w 180 ml bezwodnej pirydyny chłodzi się do temperatury -20°C , a następnie dodaje mieszaninę 18 ml dyminy kwasu siarkowego (65% SO_3) i 16 ml stężonego kwasu siarkowego, przy czym utrzymuje się temperaturę nie przekraczającą -15°C . Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 15 g glikopeptydu otrzymanego z kazeiny mleka krowiego, suszy i rozdrabnia w młynie kulowym podczas mieszania w temperaturze 20°C . Następnie temperaturę mieszaniny podwyższa się do 75°C i utrzymuje ją w ciągu 2,5 godz. Po czym mieszanie przerywa się i mieszaninę utrzymuje się w temperaturze 75°C w ciągu 90 minut.

Oleistą masę odłożoną na dnie naczynia reakcyjnego oddziela się od fazy górnej przez dekantację. Dodanie 120 ml alkoholu metylowego powoduje wytrącenie kleistego osadu, który przemywa się najpierw metanolem, a następnie eterem etylowym, otrzymując 23 g proszku koloru jasnobrązowego. Surowy produkt rozpuszcza się w 250 ml wody destylowanej i oczyszcza w sposób analogiczny do opisanego w poprzednim przykładzie.

Otrzymuje się 16 g proszku koloru kości słoniowej o następującym składzie:

Wilgotność = 5,45%
S = 8,48%
N = 6,96%
P = 0,24%
Heksozaminy = 7,32%
Heksozy = 11,53%
Proteiny = 47,15%
Kwas N-acetyloneuraminowy = 6,1%
Lepkość = 1,195 cP
Wartość pH = 6 (1% w 0,5% NaCl)
Na = 6,1%

Przykład III. Mieszaninę 200 g bezwodnej pirydyny i 300 g metylosulfotlenku chłodzi się do temperatury -20°C . Do mieszaniny wkrapla się 50 ml kwasu chlorosulfonowego, przy czym utrzymuje się temperaturę nie przekraczającą 20°C . Po dodaniu kwasu chlorosulfonowego mieszaninę utrzymuje się w temperaturze 20°C . Następnie do mieszaniny dodaje się 15 g glikopeptydu wyekstrahowanego z mleka, który uprzednio osuszono i dokładnie rozdrobniono w młynie kulowym.

Po dodaniu glikopeptydu mieszaninę ogrzewa się do temperatury 85°C i utrzymuje się ją w ciągu 4 godz. Następnie mieszaninę pozostawia się do odstania w temperaturze pokojowej w ciągu 3 godz. Na dnie reaktora odkłada się żelatynowa przezroczysta masa, którą oddziela się od górnej fazy przez dekantację. Dodanie 120 ml metanolu powoduje, że z żelatynowej masy wytwarza się produkt koloru kości słoniowej, który rozpuszcza się w 200 ml wody destylowanej i poddaje oczyszczaniu w sposób analogiczny do opisanego w poprzednich przykładach.

Ostatecznie otrzymuje się 18 g proszku koloru białego o następującym składzie (w odniesieniu do suchego produktu):

S = 9,1%
N = 6,7%
P = 0,2%
Heksozaminy = 7,6%
Heksozy = 11,2%
Kwas N-acetyloneuraminowy = 5,8%
Lepkość = 1,2 cP
Wartość pH = 6
Na = 6,3%

Przykład IV. 100 g soli sodowej glikopeptydu wyekstrahowanego z mleka krowiego i sulfonowanej w sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I rozpuszcza się w 1000 ml wody i wlewa do 1000 ml 0,3 M roztworu azotanu bizmutu w lodowatym kwasie octowym.

Jeżeli do otrzymanego roztworu doda się 2000 ml metanolu wytrąci się osad. Osad zbiera się przez odwirowanie i przemywa 3-krotnie za pomocą mieszaniny metanol—kwas octowy 3:1, a następnie 3-krotnie acetonem, otrzymując 110 g proszku. Proszek suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem i rozpuszcza się w 15 objętościach destylowanej wody. Do roztworu dodaje się 1 N roztwór wodorotlenku sodu, aż do wartości pH 6,5. Po rozcieńczeniu 1,5 objętościami acetonu wytrąca się osad. Osad zbiera się przez odwirowanie, przemywa 3-krotnie mieszaniną aceton : woda 2 : 1 i 3-krotnie acetonem. Końcowy produkt po osuszeniu pod zmniejszonym ciśnieniem daje 105 g produktu zawierającego 7,8% S i 17,1% Bi.

Przykład V. Postępując w sposób analogiczny do opisanego w przykładzie IV otrzymuje się następujące sole sulfonowanego glikopeptydu:

a) sól magnezową sulfonowanego glikopeptydu.

Analiza: Mg = 5,3 S = 9,1

b) sól wapniową sulfonowanego glikopeptydu.

Analiza: Na = 5,6 S = 8,9

c) sól glinową sulfonowanego glikopeptydu.

Analiza: Al = 8,6 S = 8,6

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania sulfoglikopeptydów z glikopeptydów ekstrahowanych z mleka lub kazeiny, **znamienny tym**, że wytwarza się mieszaninę glikopeptydów wyekstrahowanych z mleka lub kazeiny, aprotycznego, niearomatycznego rozpuszczalnika mieszanego się z wodą, trzeciorzędowej zasady o temperaturze wrzenia około 100—250°C, sulfonu-

jącego środka, takiego jak kwas siarkowy, oleum, kwas chlorosulfonowy lub addunkt bezwodnika siarkowego i związku organicznego, utrzymuje początkową temperaturę kontaktowania wymienionego glikopeptydu i wymienionego środka sulfonującego od -20°C do +20°C, ogrzewa mieszaninę do temperatury 60—90°C i wydziela otrzymany sulfoglikopeptyd.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aprotyczny rozpuszczalnik stosuje się dwumetyloformamid, dwumetylosulfotlenek, sześciometylofosforamid lub dwumetyloacetamid.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako trzeciorzędową zasadę stosuje się zasadę heterocykliczną, taką jak pirydyna, metylopirydyna, dwumetylopirydyna i chinolina.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wytworzoną mieszaninę kontaktuje się ze środkiem sulfonującym w czasie 4—8 godzin.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sulfoglikopeptyd poddaje się reakcji z wodorotlenkiem, takim jak wodorotlenek metalu alkalicznego, metalu ziem alkalicznych lub amonu, przy czym przeprowadza się sulfoglikopeptyd w sól metalu alkalicznego, metalu ziem alkalicznych lub amonową, którą wytrąca się acetonem.

6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że jako wodorotlenek stosuje się wodorotlenek sodu, a jako sól sulfoglicylopeptydową wytwarza się sól sodową.

7. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że wodny roztwór soli sodowej perkoluje się przez żywicę kationowymienną zawierającą jako kation metal, taki jak cynk, wapń, bar, stront, miedź, nikiel, kobalt, magnez, bizmut, złoto i glin.