



18

229288
229288

P A T E N T E
D E
I N T R O D U C C I Ó N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE PREPARADOS DECOLOREADOS DE HEPARINA", a favor de DOÑA PILAR GARRIGA MAS, domiciliada en MOYA (Barcelona), calle Wagner, nº 3, de nacionalidad española.

• • •

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de preparados decolorados de heparina.

- En la elaboración corriente de los preparados de heparina, por ejemplo mediante hígado o pulmones de animales (ver por ejemplo la Patente Neerlandesa 62.276) no es posible proceder de tal modo que el preparado final esté exento de impurezas coloreadas. El color de los conocidos preparados, varía, según la mayor o menor concentración de estas impurezas, entre marrón claro y varias tonalidades de amarillo claro.
10. En general es de desear que estos preparados, los cuales,



220288

18

como es sabido, se aplican para evitar la coagulación de sangre, sean más o menos incoloros.

- Es conocida la manera de purificar los preparados de heparina con la ayuda del reactivo de Lloyd a través de la sal insoluble de bario, ver Hamann-Myrback, "Métodos de la exploración fermentativa", tomo I (1941), páginas 259-265. Los preparados así purificados, aunque "son blancos" ellos mismos, dan, sin embargo, una solución coloreada entre amarillo y marrón, lo que precisamente no es de desear.
5. Se ha comprobado ahora que los preparados decolorados pueden elaborarse, sometiendo los concentrados de heparina a un blanqueo oxidativo.
10. Para este fin pueden aplicarse los agentes corrientes de oxidación, así por ejemplo los óxidos, los peróxidos, los perácidos, las amidas halogenadas en N, tales como la bromacetamida en N, la bromosuccinimida en N, y análogas. Pero se utilizan de preferencia el ozono y las sales de los hidrácidos halogenados. La heparina puede someterse tanto en estado sólido como en disolución a un blanqueo según el invento.
15. Probablemente se eliminan por la oxidación también las fracciones menos activas de heparina. Ello es tal vez la causa de la pérdida insignificante en actividad durante el blanqueo oxidativo. En efecto una pérdida relativamente grande por oxidación de estas fracciones menos activas lleva sólo a una pequeña disminución de la actividad total. Desde luego se ha de cuidar eligiendo las circunstancias de reacción, que la misma heparina sufra lo menos posible disminuciones en su actividad. Para ello se pueden variar diversos factores como, por ejemplo, la concentración de la solución que contenga heparina, la cantidad del agente oxidante, el tiempo del proceso oxidativo, la temperatura y el pH del medio.
- 20.
- 25.
- 30.

229288

18



Se comprobó que la pérdida en actividad es muy insignificante si el blanqueo según el invento se efectúa a una temperatura de cere a cinco grados centígrados. Además resultó ser favorable de aplicar el sistema de trabajar sobre una disolución de heparina del 20%.

5.

Un efecto muy favorable se alcanza si la oxidación se efectúa con ozono, en particular en caso de pH de 4 a 6. Si se lleva una mezcla de oxígeno que contenga ozono a una disolución de heparina de 5 a 10% a una temperatura de 0 a 5° C, la pérdida en componentes activos durante el blanqueo es sólo de un porcentaje muy pequeño.

10.

Se obtiene también un resultado muy bueno por medio de un blanqueo oxidativo con sales de oxácidos halogenados, tales como los álcalis : hipoclorito, hipebromito, cloruro, clorato, bromato y yodato. De preferencia se aplica entre éstos el hipoclorito de sodio siendo el pH en este caso de 6 a 8.

15.

Desde la disolución blanqueada se obtiene por la vía de precipitación la heparina casi incolora en forma de polvos, seguido por ejemplo por una centrifugación. En caso de precipitación de heparina desde una disolución no blanqueada las impurezas coloreadas se precipitan junto con la heparina. La precipitación de la heparina desde una disolución que esté blanqueada según el invento, proporciona en cambio una separación de las impurezas coloreadas (que permanecen en la disolución) y de la heparina, por lo cual se obtiene un efecto especial con el blanqueo oxidativo. Una disolución del producto final, en forma de polvos, de unos 5000 U/ml. tiene sólo un color amarillo muy débil.

20.

25.

Como efecto suplementario y ventajoso se presenta en la mayoría de los casos durante el tratamiento conforme el invento además una disminución de la pirogenidad.

30.



229288

En la literatura se escribe en algunos sitios referente a la acción del ácido periódico sobre la heparina así por ejemplo M.L. Wolfrom y otros, J.A.C.S. 72, 5796 (1950). En esta publicación se habla, sin embargo, de investigaciones sobre la estructura de la heparina. Ha resultado que esta materia se oxida por medio de ácido periódico y la oxidación de las fracciones menos activas de heparina es más importante que la de las fracciones más activas.

5. No era de prever que por la influencia de un agente oxidante pudiera alcanzarse un blanqueo efectivo, sin que en tal operación se atacara de un modo significativo la misma heparina.

10. En efecto, por la influencia de un agente oxidante pudiera esperarse antes una descomposición de la heparina, dado que, como se ha comprobado (ver J.A.C.S. 72, 5796 y consecutivos (1950)) el componente sacarideo de la heparina posee dos grupos hidroxilos y precisamente cerca, en átomos de C vecinos, cuya agrupación puede dar lugar a la llamada partición del glicol, lo que pudiera tener consecuencias funestas para la actividad.

15. Para mayor claridad del sistema según el invento sirvan los siguientes ejemplos.

EJEMPLO I.

20. Se disuelven 5 g. de sal Na de heparina con una actividad de 118 U/mg en 100 ml de agua. Se acidifica la disolución marrón de 5%, que se ha obtenido, con acético glacial hasta llegar a un pH de 4,0 y luego durante 24 minutos a temperatura ambiente se introduce oxígeno que contenga ozono. Después de terminarse el blanqueo se transforma el sobrante de ozono y los ozonidos, que acaso se hayan formado, con una disolución de sulfito sódico 2N. Luego se diluye la disolución hasta que la concentración de heparina sea del 2%. Después se neutraliza la disolución con hidróxido

25.

30.



18

229288

- sódico 2N, se añade 0,9% de sal común (peso/volumen) y se filtra a través de un filtro Seitz. Por medio de los resultados de algunas comparaciones de contraste antes y después del blanqueo se determina la pérdida de actividad. Esta es de un 8%. Finalmente se lleva el pH a 7,5 después de lo cual se precipita la heparina por medio de acetona. El precipitado, después de que haya estado una noche en reposo se centrifuga, se lava y se seca. Una disolución de los polvos obtenidos de 5000 U/ml. tiene una tonalidad amarilla verdosa muy clara. La absorción determinada en un colorímetro Coleman, importa para una longitud de onda de 425 milimicros 0,15.
- 5.
- 10.

EJEMPLO II.

- Una solución del 10% de sal sódica de heparina se acidifica con ácido sulfúrico 2N a un pH 4. La disolución de color oscuro se ozoniza a temperatura ambiente durante 20 minutos. El color de la disolución es entonces de un amarillo verdoso muy claro. La pérdida de actividad, determinada por algunas comparaciones de contraste antes y después del blanqueo es de 5%.
- 15.

EJEMPLO III.

- De 15 g. de sal sódica de heparina con una actividad de 135 U/mg se prepara una disolución del 10% en agua. La disolución fuertemente coloreada se acidifica con ácido acético glacial a un pH 4,2. Durante 21 minutos se pasa ozono a través de la disolución. Con una introducción alargada ya no se cambia el color notablemente. El exceso de ozono y los ozonidos formados se transforman luego mediante una adición de una disolución de sulfite sódico 2N. Después de diluir la disolución con agua hasta que la concentración de heparina sea de 2%, después de la adición de hidróxido sódico 2N hasta que un pH de 7,5 haya sido alcanzado, y después de haber añadido sal común hasta un porcentaje de 9% (peso/vol.) la disolución es filtrada a través de un filtro Seitz.
- 20.
- 25.
- 30.

229288



5. La precipitación con dioxán produce un sedimento que después del lavado y secado posee una actividad de 12 g. U/mg. La pérdida en actividad durante el blanqueo es de 9%. La absorción de una disolución de 5000 U/ml de este preparado blanqueado a una longitud de onda de 425 milicras es de 0,13.

EJEMPLO IV.

10. Se prepara una disolución de 0,33 de hipobromito sódico N mezclando 50 ml de hidróxido sódico N bajo refrigeración con hielo con 100 ml de agua saturada de bromo (4%, 0°C). Se añade a temperatura ambiente 0,5 ml de esta disolución de hipobromito a 5 ml de una disolución de sal sódica de heparina al 2%. La mezcla reactiva alcalina cambia con rapidez de color. Después de medio minuto el color marrón a pasado a un color amarillo muy claro.

EJEMPLO V.

15. A 50 ml de una disolución de heparinato sódico de 2% se añade 2,5 ml de una disolución de peróxido de hidrógeno del 30%. El color desaparece sólo muy lentamente. Se deja reposar la mezcla durante 51 horas a temperatura ambiente. Luego se quita el resto de peróxido, añadiendo una disolución de sulfite sódico. El color marrón de la disolución ha cambiado en un color amarillo claro.
20. La comparación de contraste de la actividad antes y después del blanqueo demuestra que prácticamente no se ha producido ninguna pérdida en componentes activos. Se recogen los polvos de heparina de la mezcla del modo conocido. El color de una disolución de estos polvos de 5000 U/ml demuestra una absorción de 0,58 a una
25. longitud de onda de 425 milimicras.

EJEMPLO VI.

30. A 50 ml de una disolución de heparinato sódico de 2% se añade a temperatura ambiente 2,5 ml de una disolución de hipoclorito sódico 2N. Se neutraliza la disolución. Después de un tiempo de

229288

18



acción de unos 5 minutos ya no se verifica ninguna decoloración más y lo que queda del color es de una tonalidad débil de amarillo. El exceso de hipoclorito se elimina con una disolución de sulfito sódico. La pérdida en actividad durante el blanqueo es prácticamente cero. Una disolución de 5000 U/ml elaborada con los polvos obtenidos aislando la heparina, del modo conocido, de la disolución blanqueada, tiene una extinción de 0,50 a una longitud de onda de 425 milimicras.

5. Al efectuar el blanqueo oxidativo a una temperatura de entre 0 y 5° C, la duración mínima de la reacción es de unos 10 minutos. Así se alcanzan los mismos resultados como los mencionados antes.

EJEMPLO VII.

10. Se deja actuar 5 ml de hipoclorito sódico 2N durante 10 a 15 minutos en 100 ml de una disolución de heparinato sódico de 20% a una temperatura de 3° C cuidando que la mezcla de reacción sea neutra. Después de terminarse la reacción, se quita el exceso de hipoclorito del mismo modo como dicho Ejemplo VI. El color de la disolución de heparina se ha alterado de marrón a amarillo claro. La pérdida de actividad es de un 7%. Desde la disolución blanqueada se obtienen del modo conocido los polvos de heparina. Una disolución de ésta de 500 U/ml deja ver una absorción de 0,50 a una longitud de onda de 425 milimicras.

15. La invención, en su esencialidad, podrá ser llevada a la práctica en otras formas de realización que difieran en detalle de las indicadas a título de ejemplo en la descripción, a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá, 20. pues, ser desarrollada con los medios y aparatos más adecuados, por quedar todo ello comprendido en el espíritu de las reivindicaciones.



229288

N O T A

Descrito el invento, lo que se declara como no divulgado ni practicado en España, comprende las siguientes reivindicaciones:

5. 1. Procedimiento para la obtención de preparados decolorados de heparina, caracterizado porque se somete a un concentrado de heparina a un blanqueo oxidativo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se blanquea a una temperatura de unos 0 a 5° C.
10. 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el producto de partida es una disolución de heparina de un 20%.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se aplica ozono como agente oxidante.
15. 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque se blanquea a un pH de unos 4 a 6.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se emplean sales de oxácidos halogenados como agente oxidante.
20. 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque se aplica hipoclorito sódico como agente oxidante a un pH que se encuentre entre 6 y 8.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque la heparina es separada de la solución blanqueada, por precipitación, en forma de polvo.
25. 9. Procedimiento para la obtención de preparados decolorados de heparina.



229288¹⁸

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

Madrid, a 18 de junio de 1956.

PILAR GARRIGA MAS.

p.a.

JAIME ISERN MIRALLES

P. P.

