

380578



380578

SECCION TECNICA
CLASIFICACION P. C.
CLASE <u>A61</u>
SUBCLASE <u>K</u>

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INTRODUCCION

SOLICITANTE: CANADA PACKERS LIMITED.

RESIDENCIA: 95 St. Clair Avenue West, TORONTO,

Ontario, Canadá.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICA-
CION DE HEPARINA CRUDA".

Prioridad: Patente n.º del

ES

380578

- 9



1 Este invento se refiere a un procedimiento para
la purificación de heparina cruda y en especial a la sepa-
ración de las impurezas coloreadas de la heparina cruda
para proporcionar un producto que forme una solución esen-
5 cialmente transparente e incolora.

La heparina pertenece a una clase de sustancias de
los tejidos animales que son denominados mucopolisacáridos
sulfatados. Esta sustancia presenta la propiedad única de
inhibir fuertemente la coagulación de la sangre. Por esta
10 razón, es utilizada como anticoagulante en la cirugía vas-
cular, en el tratamiento de la trombosis y para impedir la
trombosis post-operatoria. La heparina se encuentra en el
hígado, pulmones y tejido de la mucosa que recubre el in-
testino delgado de los animales. Puede ser aislada por va-
rios procedimientos conocidos. Algunos de ellos están des-
critos en la literatura de patentes, por ejemplo en las
15 patentes estadounidenses 2.884.358 y 2.954.321. La heparina
cruda, ahora disponible por métodos conocidos y habitual-
mente en forma de sal sódica, puede tener una actividad
de, por ejemplo, 80-100 Unidades Internacionales por mili-
gramo (U.I./mg, medido por el método de ensayo normalizado
contenido en la Farmacopea de Estados Unidos). Sin embargo,
esta heparina cruda está caracterizada casi invariablemen-
te por un color que puede oscilar entre pardo y amarillo.
25 Se han realizado muchos intentos para eliminar esta colora-
ción con objeto de obtener un producto blanco sustancial-
mente puro que forme una solución incolora.

Para blanquear la heparina cruda se han propuesto
diversos agentes oxidantes. Como la acción de los agentes
oxidantes es muy intensa, siempre existe el peligro de que
30

380578 - 9



1 ataquen no solamente a las impurezas coloreadas sino tam-
 bién a la propia heparina. Por lo tanto, el uso de agentes
 oxidantes debe ser controlado estrechamente.

5 En una reciente patente estadounidense, número
 2.830.931, se describe el uso de los permanganatos para la
 eliminación de las impurezas coloreadas de la heparina.
 Esta patente descubre que la heparina puede ser blanquee-
 da calentándola en un medio acuoso con el permanganato a
 una temperatura comprendida entre 60° y 90°C y que el pH
10 debe ser controlado muy cuidadosamente dentro del interva-
 lo de 8,0 a 8,5. En la patente canadiense 624.095 también
 se describe el uso de los permanganatos como agentes de
 blanqueo y, además, se sugiere que pueden utilizarse los
 bromatos, perboratos, persulfatos, hipocloritos, cloratos,
15 dicromatos, cromatos, yodatos, hipoyoditos, peryodatos e
 hipobromitos, así como los halógenos, cloro, bromo y yodo.
 El reactivo permanganato preferido puede ser utilizado en
 exceso, a la temperatura ambiente, pero este exceso debe
 ser separado posteriormente con un agente reductor suave
20 como el formaldehído.

 El presente invento tiene como objeto general la
 preparación de heparina purificada a partir de un material
 de heparina cruda.

25 Otro objeto del invento es proporcionar un proce-
 dimiento para la separación con éxito de las impurezas
 coloreadas de la heparina cruda mediante el uso de peróxido
 de hidrógeno.

 Otro objeto del invento es proporcionar un proce-
 dimiento relativamente sencillo de preparación, a partir
30 de heparina cruda, de un producto sustancialmente incoloro

380578

= 9



1 con una actividad heparínica específica mayor.

5 El procedimiento del invento en sus aspectos am-
plios comprende la purificación de heparina cruda elevando
el pH de una solución acuosa de dicha heparina cruda me-
diante la adición de una base fuerte hasta que dicha solu-
ción se vuelve suficientemente alcalina para producir la
10 formación de un precipitado de impurezas, separación de
las impurezas precipitadas de la solución, adición de pe-
róxido de hidrógeno a la solución alcalina en cantidad su-
ficiente para blanquear las impurezas coloreadas de la he-
parina, mantenimiento del pH de la solución resultante en
la región alcalina durante el blanqueo, preferiblemente
ajustando inicialmente el pH entre 8,5 y 9,5, es decir
aproximadamente a pH 9, después de la adición del peróxido
15 de hidrógeno, permitiendo que la solución permanezca en
reposo hasta que se ha completado la operación de blan-
queo y después recuperando la heparina de la solución.

20 Se ha encontrado que la heparina cruda puede ser
purificada satisfactoriamente por este procedimiento y que,
incluso a la temperatura ambiente o más baja, la acción de
blanqueo del peróxido de hidrógeno es razonablemente rápi-
da y completa. No se produce ninguna pérdida de actividad
heparínica y el volumen del peróxido de hidrógeno no tiene
que ser estrictamente controlado.

25 El control del pH es una característica importante
del procedimiento. Este se consigue mediante el uso de una
base fuerte como los hidróxidos de metales alcalinos, v.g.
NaOH y KOH. Se ha encontrado que si una solución acuosa de
heparina cruda, que habitualmente tiene un pH alrededor de
30 8, se ajusta a un pH de 11 aproximadamente o mayor con hi-

380578



1 dróxido sódico u otra base fuerte, se forma un precipitado
floculento que es fácilmente separable por sedimentación
o filtración. El pH exacto al cual se forma este precipi-
5 tado depende hasta cierto punto de la concentración de la
solución de heparina. Las soluciones de concentración más
baja requieren valores más altos de pH, es decir, el pH
es más crítico a concentraciones más bajas. Con una solu-
ción de heparina a una concentración del 1 %, puede ser
conveniente elevar el pH hasta 12,5 o más. Por otra parte,
10 las soluciones de heparina a concentraciones del 5 %, en
algunos casos, han formado un precipitado satisfactorio a
un pH tan bajo como 10. El pH exacto que ha de ser utili-
zado para una solución particular de heparina puede ser
determinado muy bien por el operario, guiado por el cono-
15 cimiento de que debe formarse un precipitado dentro del
intervalo general de pH comprendido entre 11 y 13 aproxima-
damente para las soluciones de heparina de una concentra-
ción del 1 % o superior. Se prefiere que la solución de
heparina a la cual se agrega una base fuerte tenga una
20 concentración de heparina de 2-10 % aproximadamente, con-
siderándose ideal una concentración del 5 %.

La naturaleza exacta de esta materia precipitada
no es conocida, pero prácticamente no contiene ninguna ac-
25 tividad heparínica y por lo tanto debe ser considerada co-
mo un diluyente indeseable. Se ha encontrado que es impor-
tante separar el material precipitado de la solución antes
de añadir el peróxido de hidrógeno. Si no se separa, en
general el blanqueo tiene menos éxito. Asimismo, la hepa-
rina final producida tendrá una actividad más baja, al es-
30 tar diluída con la materia inerte.

380578



70

1 Después de haber agregado el peróxido de hidrógeno
a la solución alcalina de heparina, normalmente se produce
un descenso del pH debido a la naturaleza ácida de este
reactivo. Así, el valor del pH de la solución de heparina
5 puede descender desde pH 11 o más alto a menos de 9. Ade-
más se ha encontrado que es una característica importante
del invento el hecho de que, al principio del periodo de
blanqueo, el pH esté comprendido aproximadamente entre 8,5
y 9,5 y sea preferiblemente 9. El pH puede ser ajustado
10 mediante la adición de hidróxido sódico cuando desciende
por debajo del valor deseado a consecuencia de la adición
de peróxido de hidrógeno. El blanqueo de la solución de
heparina con peróxido de hidrógeno se produce en condi-
ciones más alcalinas o más ácidas. Sin embargo, el pH tie-
15 ne tendencia a descender durante el periodo de blanqueo y
la heparina puede ser inactivada a pH ácido debido a la
separación de algunos de sus grupos sulfato. El ajuste del
pH dentro del intervalo dado al principio del periodo de
blanqueo constituye una salvaguardia contra la caída a la
20 región ácida. Alternativamente, el pH puede ser ajustado
de vez en cuando durante el periodo de blanqueo para garan-
tizar las condiciones alcalinas. A valores de pH superiores
a 9,5, el blanqueo con peróxido de hidrógeno parece ser
menos rápido y completo. Por lo tanto, es conveniente man-
25 tener el pH por encima de 7,0 y por debajo de 9,5 durante
la fase de blanqueo.

 Después de haber agregado el peróxido de hidrógeno
a la solución de heparina cruda y haber ajustado el pH a
9,0 aproximadamente, la solución resultante puede dejarse
30 en reposo a la temperatura ambiente durante toda la noche

380578



1970

1 para completar la acción de blanqueo. El blanqueo a esta
temperatura es prácticamente completo dentro de las 12-
24 horas. El tiempo, sin embargo, no es exactamente críti-
co y puede ser reducido mediante un aumento de la tempera-
5 tura y aumentado a temperaturas inferiores a la ambiente.
Así, la temperatura de la solución puede elevarse, por
ejemplo, hasta aproximadamente 50°C y completarse el blan-
queo en algunas horas sin ningún efecto sustancial sobre
la actividad heparínica. En general, se puede trabajar con
10 temperaturas comprendidas entre 0° y 60°C pero se prefieren
las temperaturas más suaves dentro de este intervalo.

La concentración de peróxido de hidrógeno no es
exactamente crítica y se ha encontrado que se obtienen re-
sultados satisfactorios cuando se agrega alrededor del 5 %
15 al 25 % en volumen, calculado sobre la solución de hepari-
na, de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % so-
bre una solución de heparina a una concentración del 5 %,
siendo el óptimo aproximadamente el 10 % en volumen. La
cantidad de solución de peróxido de hidrógeno puede ser
20 fácilmente ajustada para proporcionar la acción de blanqueo
necesaria para la remesa y la concentración particulares de
la solución de heparina que está siendo tratada. No parece
que sea perjudicial un exceso de H₂O₂.

También se ha encontrado que la heparina cruda pue-
de contener cantidades apreciables de ácidos nucleicos. Los
25 ácidos nucleicos son fácilmente detectados por su absor-
ción característica de la luz ultravioleta de una longitud
de onda específica. Se prefiere que el contenido en ácidos
nucleicos de la heparina se mantenga en un valor bajo, aun-
que estas sustancias no afectan materialmente al valor te-
30



1 rapéutico de la heparina. Por consiguiente, otra caracte-
rística del presente invento comprende la reducción del
contenido en ácidos nucleicos de la heparina cruda. Prefe-
5 riblemente, esto se realiza antes de la fase de blanqueo,
pero también puede realizarse después de haber completado
el blanqueo.

10 Los ácidos nucleicos son insolubles a valores ba-
jos del pH, pero las condiciones ácidas destruyen la he-
parina. Diversos adsorbentes, como ciertos tipos de car-
bones vegetales activos y arcillas naturales y activadas,
v.g. tierra de Fuller y bentonita, adsorben los ácidos nu-
cleicos pero cada uno de estos adsorbentes lleva sus pro-
blemas asociados. Así, los carbones vegetales activados
también pueden adsorber parte de la heparina y los adsorben-
15 tes de arcilla tienen poca capacidad y malas propiedades
de filtración.

20 Ahora se ha encontrado que un silicato magnésico
hidratado sintético presenta una excelente capacidad adsor-
tiva de los ácidos nucleicos y, además, posee buenas pro-
piedades de filtración. Uno de estos adsorbentes de silica-
to de magnesio hidratado se encuentra en el mercado con
el nombre de "CELKATE", fabricado por la Johns-Manville
Company, Celite Division, New York, N.Y. Por lo tanto, en
el procedimiento preferido del presente invento, las solu-
25 ciones de heparina cruda, y en particular aquellas cuyo
análisis ha demostrado que tienen un elevado contenido en
ácidos nucleicos, son tratadas con el adsorbente de silica-
to magnésico hidratado sintético antes de ser blanqueadas
con peróxido de hidrógeno.

30 Es sabido que la actividad de la heparina cruda

380578



1970

1 puede ser aumentada por fraccionamiento con disolventes.
Este puede realizarse disolviendo la heparina blanqueada
en solución salina y agregando acetona hasta una concen-
5 tración del 40 % en volumen aproximadamente. A esta con-
centración, precipita heparina de gran actividad. Se sepa-
ra ésta y la concentración de acetona de la solución resi-
dual se eleva entonces hasta el 60 % aproximadamente, a
cuya concentración precipita una fracción de heparina de
menor actividad. En los casos en los que la heparina blan-
10 queada tiene una actividad de 80-100 U.I./mg, la actividad
de la primera fracción precipitada con acetona puede ser
del orden de 150-170 U.I./mg. Por consiguiente, con objeto
de obtener un producto de heparina prácticamente pura, de
gran actividad, el procedimiento del invento incluye la
15 separación de los ácidos nucleicos de la heparina por trata-
miento con un adsorbente de silicato magnésico, ajuste del
pH de una solución acuosa de la heparina dentro de una re-
gión comprendida entre pH 11 y 13 mediante la adición de
hidróxido sódico, separación del precipitado formado a es-
20 te pH, adición de peróxido de hidrógeno a la solución alcali-
na de heparina y blanqueo de dicha solución con el peró-
xido de hidrógeno agregado a un pH comprendido aproxima-
mente entre 7,0 y 9,5, recuperación de la heparina de esta
solución y fraccionamiento con disolvente de la heparina
25 blanqueada para proporcionar una fracción de gran actividad
específica heparínica.

EJEMPLO 1

Separación de la materia insoluble de la heparina cruda a
pH elevado

30 Se preparan tres soluciones de heparina cruda a

380578



NOV 1970

1
5
10
15
20
25
30

unas concentraciones del 1 %, 2,5 % y 5 % en peso, respectivamente. Dos muestras de cada una de las tres soluciones se ajustan a pH 11,5 y pH 12,5 mediante la adición de NaOH 5 N. En todas las muestras se produce una turbidez a pH 11,5. En todas las muestras, se forma un precipitado flocculento a pH 12,5, que se sedimenta en 15-30 minutos.

Las seis muestras son centrifugadas en tubos tarados hasta que el líquido que sobrenada es transparente. Los precipitados se lavan con NaOH diluido, a un pH igual al de precipitación, se centrifugan de nuevo y los precipitados se secan a vacío a 50°C hasta que alcanzan un peso constante al cabo de 4 días.

Los resultados se encuentran tabulados a continuación:

<u>Concentración de heparina cruda</u>	<u>pH</u>	<u>% en peso del crudo que ha precipitado</u>
1 % en peso		1,0
2,5 % "	11,5	0,6
5,0 % "		3,3
1 % "		3,1
2,5 % "	12,5	3,2
5,0 % "		3,9

Estos datos indican que el pH más adecuado para la precipitación de las impurezas insolubles en los álcalis, sobre toda la gama de concentraciones, es de 12,5 en esta heparina cruda. A una concentración de 5,0 % en peso, la cantidad de impurezas precipitadas a pH 11,5 es ligeramente menor que a pH 12,5, pero a concentraciones más bajas, la cantidad de impurezas precipitadas al pH más bajo es considerablemente menor.

380578



370

EJEMPLO 2

Efecto del pH sobre el blanqueo con peróxido de hidrógeno

Se precipita heparina cruda de acetona al 60 %. El precipitado se seca y se disuelve en agua dando una solución al 5 %, pH 7,6. El índice de color es 52, medido en un colorímetro Klett con un filtro azul (Colorímetro Fotoeléctrico Klett-Summerson, fabricado por Klett Manufacturing Company, New York, N.Y.). Se disuelve NaOH sólido en esta solución para dar un pH de 12,4. Después de filtrar, se agregan 0,2 volúmenes de H₂O₂ al 30 %. El pH desciende a 8,65; el índice Klett es 41.

Cuatro porciones de la solución, a la temperatura ambiente, se ajustan a pH 8,0, 9,0, 10,0 y 10,9 y el resto se deja a pH 8,65. En la siguiente tabla, estas porciones son denominadas A, B, C, D, y E por orden de pH. Los índices Klett son determinados a intervalos.

	A		B		C		D		E	
<u>Tiempo</u>	<u>pH</u>	<u>Klett</u>	<u>pH</u>	<u>Klett</u>	<u>pH</u>	<u>Klett</u>	<u>pH</u>	<u>Klett</u>	<u>pH</u>	<u>Klett</u>
cero	8,0	41	8,65	41	9,0	41	10,0	41	10,9	41
17 horas	6,7	4	8,0	5	9,0	4	11,0	11	11,2	14
24 horas	6,2	0	7,6	0	8,9	0	11,0	7	11,1	10

El blanqueo es igualmente eficiente a la temperatura ambiente cuando el pH inicial es 8,0, 8,65 ó 9,0. El pH de la solución A, inicialmente 8,0, desciende hasta la región ácida durante el periodo de blanqueo. La heparina puede ser desulfatada a pH ácido. Por lo tanto, se prefiere un pH inicial de 9,0 aproximadamente después de la adición del H₂O₂, ya que en este caso el pH no desciende apreciablemente.



380578

EJEMPLO 3

Blanqueo de heparina cruda con diversas concentraciones de peróxido de hidrógeno

Una solución al 5 % de heparina cruda se ajusta a pH 12,3 mediante la adición de NaOH sólido. Después de filtrar para separar las impurezas precipitadas, la solución se divide en 4 partes, a las cuales se agregan unas cantidades de H₂O₂ al 30 % que oscilan entre 5 % y 20 % en volumen. El blanqueo se realiza a la temperatura ambiente. Cuando es necesario, el pH se ajusta entre 8,8 y 9,2.

Las lecturas del colorímetro Klett se toman a intervalos, utilizando un filtro azul. Las lecturas y los ajustes de pH se realizan en la forma indicada en la siguiente tabla:

Tiempo	<u>Volumen agregado de H₂O₂ al 30 %</u>							
	5 %		10 %		15 %		20 %	
	pH	Klett	pH	Klett	pH	Klett	pH	Klett
cero pH al agregar H ₂ O ₂	9,1	24	8,8	24	8,7	22	8,5	22
Ajustado a	-	-	-	-	9,1	-	9,2	-
18 h.	-	12	-	12	-	12	-	14
24 h. pH ajustado a	7,4	-	6,7	-	8,8	-	9,2	-
	8,8	-	8,8	-	-	-	-	-
43 h.	7,4	8	6,6	6	8,7	9	9,0	12

El blanqueo presenta la máxima eficacia sobre la solución de heparina al 5 % con un 10 % en volumen de H₂O₂ al 30 %.

380578



JUN. 1970

EJEMPLO 4

Blanqueo de una solución al 5 % de heparina cruda a 50°C

Una solución de heparina cruda (concentración 5 % en peso; actividad 120 U.I./mg) se ajusta a pH 12,5 mediante la adición de NaOH 5 N. El material que flocula y se sedimenta en la solución se separa por filtración con un auxiliar de filtración de tierra de diatomeas, vendido bajo la marca "Celite". El índice Klett (azul) es 97. Se añaden 0,2 volúmenes de H₂O₂ al 30 % y el pH, que desciende a 8,8, se ajusta a 9,0 con NaOH. La solución se introduce inmediatamente en un baño de agua a 50°C y se comprueba el pH cada hora. El pH disminuye a una velocidad de 0,4 unidades/hora aproximadamente y se reajusta a pH 9,0 cada hora. Después de 5 horas, el índice Klett (azul) es 5 y la mitad de la solución se retira del baño. Se precipita la heparina con acetona al 60 % por los procedimientos normales.

El producto del blanqueo de 5 horas tiene una actividad de 125 U.I./mg. Pasa el ensayo de color y el ensayo de estabilidad del color.

La otra mitad de la solución se mantiene a 50°C durante la noche (16 horas). El pH desciende a 6,2 y el índice Klett (azul) es cero. La heparina recuperada por precipitación con acetona al 60 % tiene una actividad de 82 U.I./mg.

Por lo tanto, una solución al 5 % en peso de heparina cruda puede ser blanqueada con H₂O₂ a 50°C si se adoptan las precauciones necesarias para ajustar el pH. En la práctica, es más conveniente un blanqueo durante toda la noche a la temperatura ambiente, porque no son necesarios los ajustes de pH después del ajuste inicial del pH a 9,0

380578



NOV. 1970

1 aproximadamente.

EJEMPLO 5

Blanqueo de una solución al 1 % de heparina cruda a 50°C

5 Una solución de heparina cruda (concentración 5 % en peso; actividad 120 U.I./mg) se ajusta a pH 12,5 y se separa la materia insoluble, exactamente igual que en el ejemplo anterior.

10 El filtrado transparente se diluye con cuatro volúmenes de agua. El índice Klett (azul) es 20. Sobre esta solución se añaden 1/25 volúmenes de H₂O₂ al 30 % y el pH se ajusta a 9,0. La solución se mantiene a 50°C durante 5 horas y el pH se ajusta a 9,0 cada hora. El descenso medio del pH es alrededor de 0,1 unidades/hora. Después de 5 horas, el índice Klett (azul) es 2. La heparina se precipita con acetona al 60 % y se seca en la forma habitual. El producto final tiene una actividad anticoagulante de 127 U.I./mg; pasa el ensayo de color y el ensayo de estabilidad del color.

EJEMPLO 6

Blanqueo a 3,5°C

20 Se disuelven 2050 g de heparina cruda de cerdo en 40 litros de agua destilada y el pH se ajusta a 11,5 con hidróxido sódico al 50 %. El precipitado resultante se separa por filtración y se añaden 4 litros de peróxido de hidrógeno al 30 % a la solución transparente. El pH se ajusta a 9,1 con hidróxido sódico al 50 % y se mantiene a 3,5°C durante 21,5 horas. Durante el proceso de blanqueo, el pH se mantiene entre 8,9 y 9,1. La solución blanqueada se agita bien para eliminar los gases disueltos y se agregan 200 g de cloruro sódico. La heparina blanqueada se recupera

380578



1970

1 por precipitación con disolvente en la forma habitual.

EJEMPLO 7

5 Se disuelve heparina cruda en agua destilada para preparar una solución al 5 % aproximadamente (470 g de heparina cruda disueltos en 9 litros de agua destilada).
10 El pH de esta solución se ajusta después con hidróxido sódico al 50 % a pH 10. El precipitado formado a este pH se separa por filtración. A la solución filtrada se agregan 2,2 litros de peróxido de hidrógeno al 35 % y se mezcla íntimamente. Se determina el pH de la solución resultante y se ajusta a 9,5 con solución acuosa al 50 % de hidróxido sódico. La solución resultante se mantiene a 78°F (25°C) durante 105 horas. Una vez completada la operación de blanqueo, se agregan 165 g de cloruro sódico y la solución se
15 agita intensamente para separar el gas disuelto. Después se filtra la solución y el pH se ajusta a 7,3 con ácido clorhídrico diluido. La heparina blanqueada se precipita en la forma habitual, se filtra y se seca a vacío.

EJEMPLO 8

20 Se disuelve heparina cruda de cerdo en agua destilada (36 litros de agua destilada y 1918 g de heparina cruda). El pH de la solución se ajusta a 11,3 con solución de hidróxido sódico al 50 % y la solución se filtra para separar el precipitado que se ha formado. Sobre esta solución
25 se añaden 7,2 litros de peróxido de hidrógeno al 35 %. Después de mezclar íntimamente, el pH de la solución se ajusta a 9,0 con hidróxido sódico al 50 %. La solución resultante se mantiene a 68°F (20°C) durante 44 horas. Después de las operaciones de blanqueo, se agregan 450 g de cloruro sódico y la solución se agita intensamente para sepa-
30



1 rar el gas disuelto. Después se filtra la solución y el
pH se ajusta a 7,3 con ácido clorhídrico diluido. A con-
tinuación la heparina blanqueada se precipita, se filtra
y se seca a vacío.

5 EJEMPLO 9

Se disuelven 2 kg de heparina cruda de cerdo en
45 litros de agua destilada y el pH de la solución se ele-
va a 11,4 mediante la adición de solución de hidróxido só-
dico al 50 %. La solución se filtra para separar el preci-
10 pitado. A la solución filtrada se agregan 9 litros de peró-
xido de hidrógeno al 35 %, se agita bien la solución y el
pH se ajusta a 9 con hidróxido sódico al 50 %. Después de
dejar en reposo a 72°F (22°C) durante 19,5 horas, los ga-
ses disueltos se separan mediante violenta agitación. La
15 solución se lleva al 1 % con cloruro sódico, se ajusta el
pH a 7,2 con ácido clorhídrico diluido y la heparina blan-
queada se precipita, se filtra y se seca a vacío.

EJEMPLO 10

Se disuelve en agua destilada una heparina cruda
20 y seca de buey (122 g disueltos en 2,2 litros de agua des-
tilada). El pH de la solución se ajusta a 11,4 con hidró-
xido sódico al 50 % y la solución se filtra para separar
el precipitado. Sobre esta solución se agregan 440 ml de
peróxido de hidrógeno al 35 % que se mezcla bien y el pH
25 se ajusta a 9,1 con hidróxido sódico al 50 %. Esta solu-
ción resultante se mantiene a 72°F (22°C) durante 18,5 ho-
ras. Se añaden 26 g de sal a la solución blanqueada y se agi-
ta violentamente hasta que se han liberado la mayor parte
de los gases disueltos. Después se filtra la solución y el
30 pH se ajusta a 7,3 con ácido clorhídrico diluido. La hepa-

380578



1970

1 rina blanqueada se precipita a continuación, se filtra y se seca a vacío.

EJEMPLO 11

5 Se disuelve en agua destilada una heparina cruda de buey (1564 g de heparina disueltos en 31 litros de agua). El pH de la solución se eleva a 11,3 con hidróxido sódico al 50 % y se filtra la solución resultante. Sobre esta solución se añaden 6,5 litros de peróxido de hidrógeno al 35 %. Esta solución se agita bien y el pH se ajusta a 9,0 con hidróxido sódico al 50 %. La solución resultante se mantiene a 70°F (21°C) durante 25,5 horas. La solución blanqueada se agita después violentamente para eliminar los gases disueltos y se añaden 375 g de sal. A continuación se filtra la solución blanqueada, se ajusta el pH a 7,3 con ácido clorhídrico diluido y después se precipita la heparina, se filtra y se seca a vacío.

EJEMPLO 12

20 Una solución al 5 % de heparina cruda (actividad, 86 unidades/mg de peso seco) tiene un pH de 9,5. Este se eleva a 12,5 con NaOH 5 N. Se forma un precipitado flocculento como es habitual. Por filtración se obtiene una solución amarilla transparente, índice Klett = 106 (filtro azul). Se agregan 0,2 volúmenes de H₂O₂ al 30 %. El pH desciende a 8,9 y se ajusta a 9,0. Después de permanecer en reposo durante 24 horas a la temperatura ambiente (22 a 25 26°C), el índice Klett vale 13. La heparina blanqueada se precipita con acetona al 60 % en condiciones normales (pH, 6,7; adición de NaCl al 1 %). El precipitado seco se disuelve de nuevo dando una solución al 5 %, pH 7,2, índice Klett 11.

380578



1 La heparina se reprecipita con acetona al 50 %, se
seca y se analiza.

Análisis del producto

Actividad anticoagulante: 112 unidades/mg

5 Índice de color: Pasa el ensayo

EJEMPLO 13

Separación de los ácidos nucleicos de la heparina
cruda

10 Unas pequeñas muestras de una solución al 5 % de
heparina cruda se agitan durante la noche con determina-
das cantidades de silicato magnésico hidratado sintético
(CELKATE) que oscilan entre 5 % y 25 % (peso/volumen). A
continuación cada una de las muestras es centrifugada y
los líquidos transparentes que sobrenadan se diluyen con
15 agua y se miden sus coeficientes de extinción a 255 m μ
en un espectrofotómetro de ultravioleta.

<u>Concentración de adsorbente (pe so/volumen)</u>	<u>E^{1%} 1 cm a 255 mμ</u>
cero	55,0
20 5 %	45,3
10 %	13,6
15 %	2,6
20 %	0,6
25 %	0,9

25 La determinación de la actividad anticoagulante
indica que no se produce ningún cambio en la concentración
de heparina durante el tratamiento con este adsorbente. Las
soluciones así tratadas, preferiblemente con el 10 % como
mínimo en peso/volumen de adsorbente, son tratadas después
30 como en los ejemplos anteriores.



EJEMPLO 14

Separación de los ácidos nucleicos de heparina blanqueada y fraccionada

Una muestra de heparina cruda se blanquea con H_2O_2 y se precipita con acetona al 40 %. El producto tiene un $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ a 255 $m\mu$ = 3,00. Una solución al 5 % de este material se agita durante la noche con silicato magnésico sintético (CELKATE, 10 % peso/volumen). Con ello disminuye el $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ a 255 $m\mu$ a 0,376. El precipitado con acetona al 40 % de esta solución tiene un $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ a 255 $m\mu$ = 0,236.

De lo que antecede se deduce que las impurezas (hasta el 3 ó 4 % en peso, calculado sobre el peso de la materia cruda) pueden ser precipitadas de la solución de heparina cruda elevando el pH de la solución hasta 10 como mínimo y posiblemente dentro del intervalo comprendido entre 11 y 13 aproximadamente, mediante la adición de una base fuerte y que las soluciones de heparina así tratadas pueden ser blanqueadas con peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas, a temperaturas comprendidas entre 0° y 60°C, sin pérdida sustancial de actividad anticoagulante, dando productos con un color y una estabilidad del color aceptables. También se observará que pueden conseguirse fácilmente nuevas mejoras en la pureza mediante la separación de los ácidos nucleicos con silicato magnésico.

Debe entenderse que la palabra "heparina" en el sentido utilizado en la memoria y en las reivindicaciones incluye las sales de heparina, es decir la forma normal de la heparina. El procedimiento de blanqueo de los ejemplos se realiza sobre la sal sódica.

En resumen, la Patente de Introducción que se solicita deberá recaer sobre las siguientes: ..



REIVINDICACIONES

1
5
10
15
20
25
30

1. Un procedimiento para la purificación de heparina cruda, que consiste en elevar el pH de una solución acuosa de dicha heparina cruda mediante la adición de una base fuerte, hasta que la solución ha alcanzado aproximadamente una alcalinidad de pH 10 como mínimo y se ha formado un precipitado, separar dicho precipitado de la solución alcalina, agregar peróxido de hidrógeno a la solución alcalina resultante, blanquear dicha solución de heparina con el peróxido de hidrógeno agregado a un pH comprendido aproximadamente entre 7,0 y 9,5 y recuperar la heparina de dicha solución.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que la solución de heparina cruda tiene una concentración de aproximadamente 1 a 10 % en peso de heparina y el pH de la solución se eleva hasta aproximadamente 12,5 para producir la formación de dicho precipitado.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que la concentración de la solución acuosa de heparina cruda es del 5 % aproximadamente y la cantidad de peróxido de hidrógeno agregado a dicha solución después de separar el precipitado es equivalente a 5 a 25 % en volumen aproximadamente, calculado sobre la solución de heparina, de una solución al 30 % de peróxido de hidrógeno.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que la heparina es blanqueada a una temperatura comprendida entre 0° y 60°C.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, que comprende la operación de separar los ácidos nucleicos de la heparina por tratamiento de la solución alcalina con

380578



UN. 1970

1

un adsorbente de silicato magnésico hidratado sintético.

5

6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que después de la adición del peróxido de hidrógeno, se agrega una nueva cantidad de base fuerte para mantener las condiciones alcalinas durante el blanqueo.

10

7. Un procedimiento para la purificación de heparina cruda que contiene impurezas coloreadas, que consiste en preparar una solución acuosa de dicha heparina cruda, a una concentración del 1 % aproximadamente como mínimo, ajustar el pH de dicha solución acuosa a 11-13 aproximadamente mediante la adición de hidróxido sódico para producir la formación de un precipitado, separar el precipitado de la solución, agregar peróxido de hidrógeno a la solución alcalina en cantidad suficiente para blanquear las impurezas coloreadas de la heparina, ajustar el pH de la solución resultante a un valor comprendido aproximadamente entre 8,5 y 9,5, blanquear dicha solución de heparina en condiciones alcalinas con el peróxido de hidrógeno agregado y después recuperar la heparina de dicha solución.

15

20

8. Un procedimiento según la Reivindicación 7, en el que la solución de heparina, después de la adición del peróxido de hidrógeno y de ajustar el pH a 8,5-9,5, se deja en reposo aproximadamente a la temperatura ambiente hasta completar la operación de blanqueo.

25

9. Un procedimiento según la Reivindicación 8, en el que el pH de la solución de heparina, después de la adición del peróxido de hidrógeno, se ajusta a 9,0 aproximadamente.

30

10. Un procedimiento para la purificación de hepa-

380578



1

rina que contiene ácidos nucleicos e impurezas coloreadas, que consiste en preparar una solución acuosa de dicha heparina, tratar dicha solución acuosa de heparina con un

5

adsorbente de silicato magnésico hidratado sintético para reducir el contenido en ácidos nucleicos, ajustar el pH de la solución resultante de heparina a 11-13 aproximadamente mediante la adición de hidróxido sódico, separar el precipitado formado a este pH, agregar peróxido de hidrógeno a la solución alcalina resultante de heparina, blanquear dicha solución con el peróxido de hidrógeno agregado

10

a un pH comprendido aproximadamente entre 7,0 y 9,5 y recuperar la heparina de la solución resultante.

15

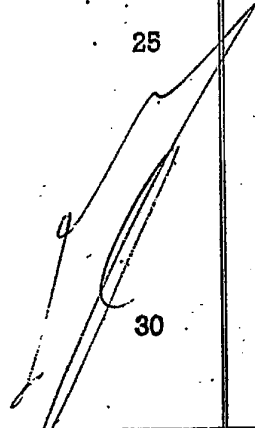
11. Un procedimiento para la preparación de un producto de heparina prácticamente puro de gran actividad heparínica, que consiste en preparar una solución acuosa de heparina cruda a una concentración de aproximadamente el 1 % como mínimo, ajustar el pH de dicha solución acuosa de heparina a 11-13 aproximadamente mediante la adición de hidróxido sódico, separar el precipitado formado a este pH, agregar peróxido de hidrógeno a la solución alcalina resultante de heparina y ajustar el pH de dicha solución a 9 aproximadamente, permitir que la solución permanezca en reposo después de la adición del peróxido de hidrógeno hasta completar sustancialmente la acción de blanqueo, recuperar la heparina de dicha solución y precipitar una fracción muy activa de dicha heparina a partir de una solución salina de la misma por adición de un disolvente orgánico.

20

25

12. Un procedimiento para la preparación de un producto de heparina relativamente puro, que consiste en

30



380578



1970

1 preparar una solución acuosa de heparina cruda a una con-
centración de aproximadamente el 1 % como mínimo, tratar
dicha solución acuosa con un adsorbente de silicato mag-
nésico hidratado sintético para separar los ácidos nucleí-
5 cos, ajustar el pH de la solución acuosa resultante de he-
parina a 11-13 aproximadamente mediante la adición de hi-
dróxido sódico, separar el precipitado formado a este pH,
agregar peróxido de hidrógeno a la solución resultante y
blanquear las impurezas coloreadas de dicha solución a un
10 pH comprendido entre 7,0 y 9,5, recuperar la heparina de
la solución blanqueada, disolver la heparina recuperada
en una solución salina acuosa y reprecipitarla de dicha
solución salina mediante la adición de acetona.

15 13. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Introducción que se so-
licita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE HEPARINA
CRUDA".

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente Memoria descriptiva, que consta de veinti-
tres páginas mecanografiadas.

Madrid, 9 de junio de 1970

BERNARDO UNGRIA

P.P.

25

30