



15

RE. CL. 0076

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INTRODUCCION

441815

SOLICITANTE: LABORATORIOS LEO, S.A.

RESIDENCIA: Avda. Pio XII, 99 - MADRID (16)

ENUNCIADO: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DE HEPARINA"

Prioridad: Patente n.º del

**POOR
QUALITY**



1 Esta invención se refiere a la preparación de heparina
y en especial a la preparación de heparina cruda a partir
de tejidos animales.

5 Uno de los objetos principales de esta invención es
proporcionar un procedimiento nuevo y mejorado para la prepa-
ración de heparina cruda.

10 Hasta ahora se han utilizado muchos métodos para extraer
y aislar la heparina de los tejidos. Howell¹, que fué pionero
en este campo, extrajo el tejido de hígado seco con alcohol
caliente para desengrasar parcialmente el tejido y después
con solución salina fisiológica para separar la heparina que
a continuación era precipitada con acetona. Esta era despro-
teinizada después con cloruro de cadmio. Más tarde, utilizó
el reactivo de Lloyd y la purificó mediante la sal de bario.

15 Scott y Charles² pusieron a punto el procedimiento que
ha constituido la base de gran parte del trabajo posterior.
Su procedimiento consistía en la extracción alcalina del te-
jido desmenuzado utilizando sulfato amónico alcalino y calor.
La heparina cruda era precipitada acidulando a pH 2. Las pro-
teínas se digerían con tripsina.

20 Kuizenga y Spaulding³ han utilizado fundamentalmente
la misma técnica pero han introducido la autólisis del tejido
antes de la extracción, lo que aumentaba considerablemente
los rendimientos. Su método de purificación fué mejorado,

25 1 William H. Howell: American Journal of Physiology, vol. 63,
pág. 434 (1922).

 2 A.F. Charles y D.A. Scott: Journal of Biological Chemistry,
vol. 102, pág. 425 (1933)

 3 M.F. Knizenga y L.B. Spaulding: Journal of Biological Che-
30 mistry, vol. 148, pág. 641 (1943).



1 aunque basado en el trabajo anterior citado.

Recientemente, se han publicado varias técnicas, la mayoría de las cuales constituyen solamente pequeñas variaciones de las anteriores.

5 Los métodos publicados para el aislamiento de la heparina presentan ciertos inconvenientes. En primer lugar, una sola extracción puede no ser adecuada para obtener un rendimiento satisfactorio. En segundo lugar, la precipitación ácida no permitir separar la totalidad de la heparina. En tercer lugar, el tejido no siempre proporciona enzimas suficientes para producir una autólisis adecuada, dependiendo de la forma en que se maneja el tejido. En cuarto lugar, el control de la contaminación bacteriana no ha resultado satisfactorio. Esta contaminación introduce olor, color y pirógenos indeseables y por consiguiente reduce el rendimiento.

10 Un objeto importante de esta invención es proporcionar un procedimiento para aislar la heparina de los tejidos animales que supera los inconvenientes citados y otros de la técnica anterior. Más específicamente, un objeto de esta invención es proporcionar un procedimiento de producción de heparina que es sencillo de realizar pero que produce grandes rendimientos de material activo.

15 Otros objetos y ventajas de esta invención creemos que serán fácilmente evidentes mediante la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la misma.

20 En pocas palabras, el procedimiento de esta invención comprende las operaciones de autólisis (preferiblemente en presencia de un enzima proteolítico donde se utiliza pulmón como materia prima), extracción alcalina, digestión en pre-

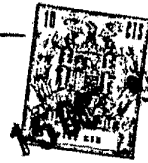
30



1 sencia de un enzima proteolítico, formación de un complejo
hidrófobo de heparina, flotación del complejo con un disolven-
te no miscible con agua, separación del complejo (fase sólida)
5 de las dos fases líquidas, separación del complejo por
precipitación en alcohol y eliminación del alcohol. La separa-
ción de la heparina de la solución de extracto por forma-
ción de complejo y flotación constituye una operación nueva
e importante en el procedimiento de esta invención.

10 El procedimiento de la invención es adecuado para uti-
lizar como materia prima el tejido de cualquier animal ade-
cuado como alimento para consumo humano. Los tejidos más ade-
cuados son los pulmones y el intestino delgado del buey. Los
15 pulmones son más caros que los intestinos pero dan un rendi-
miento considerablemente mayor. Los pulmones también son más
ventajosos que los intestinos desde el punto de vista de que
son más fáciles de almacenar en estado satisfactorio antes
de su empleo. Los pulmones pueden ser utilizados frescos o
congelados y el almacenamiento en estado congelado no ejerce
ningún efecto adverso conocido sobre el rendimiento o la ma-
20 nipulación. El tejido debe estar finamente dividido pero no
homogeneizado para uso en el procedimiento.

25 En la puesta en práctica del procedimiento, en primer lu-
gar el tejido es autolizado sometiéndolo a una temperatura de
20-40°C durante 14-20 horas, agitando suavemente. Esta opera-
ción de autólisis debe ser llevada a cabo en presencia de una
capa de un preservativo que comprenda un bacteriostato o bac-
tericida como cloroformo, tolueno u otros compuestos aromá-
ticos o combinaciones de los mismos, fenólicos o antibióticos.
30 La autólisis hasta ahora descrita es convencional. Sin embar-
go, cuando se trabaja con pulmón de buey, se ha encontrado



1 ventajoso agregar una pequeña cantidad de un enzima proteolítico como páncreas de buey, tripsina y similares. La cantidad
de páncreas puede variar entre 0 y 5 % del peso de las mate-
5 rias primas totales de acuerdo con el tratamiento anterior y
el estado del tejido utilizado. Los tejidos como el intestino
no requieren adición de enzimas ya que naturalmente poseen
cantidades sustanciales de enzima.

Después de la autólisis, el tejido es extraído con un
extractivo alcalino, preferiblemente dentro de un intervalo
10 de pH de 8-10. La solución reguladora alcalina preferida es
la de acetato amónico pero pueden utilizarse también otras
sales amónicas como cloruro, sulfato, sales de otros ácidos
orgánicos como propionato y otras sales amónicas como acetato
15 de metilamina. La extracción se lleva a cabo preferiblemente
en la forma clásica calentando a 55-60°C durante unas 2 horas,
después rápidamente a la temperatura de ebullición aproxima-
damente y a continuación retirando la fuente de calor. Es ne-
cesario agitar durante la extracción ya que el objetivo de la
cafección es coagular el tejido.

20 El extracto acuoso conteniendo heparina se separa des-
pués del sólido por filtración, preferiblemente utilizando
un auxiliar de filtración y el filtrado se digiere a unos
30-45°C en presencia de un enzima proteolítico, estando com-
25 prendido el pH del material sometido a digestión entre 7 y 9.
La digestión debe ser lo más completa posible. Esto requiere
normalmente unos 3 días con incrementos adicionales de enzi-
mas agregados a intervalos periódicos. Durante la digestión es
preferible que también esté presente un preservativo como el
30 utilizado en la autólisis.

Pueden utilizarse muchos enzimas proteolíticos como trip



157

1

5

10

15

20

25

30

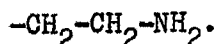
sina y proteinasas bacterianas, fúngicas, vegetales y animales con el ajuste adecuado del pH para obtener los efectos óptimos. Sin embargo, se prefiere utilizar alrededor de 5-15 galones por 1000 libras de tejido original (41,7-125,1 litros/kg) de un extracto pancreático preparado por extracción de páncreas finamente dividido con 2 volúmenes de ácido acético 0,25N, permitiendo que la mezcla permanezca en reposo en frío durante 24 horas, seguido de filtración. El extracto es estable durante algún tiempo si se mantiene en frío.

Después del periodo de digestión, el lote se calienta a una temperatura inmediatamente por debajo del punto de ebullición y luego se enfría rápidamente a la temperatura ambiente, se filtra y, preferiblemente, en el filtrado se analiza el contenido en heparina.

Al filtrado clarificado se agrega un agente de flotación. En el sentido utilizado aquí, el término "agente de flotación" significa e incluye cualquier sustancia o compuesto básico que forme complejo con la heparina y forme una sustancia insoluble o hidrófoba, incluidas pero no limitadas a las siguientes: aminas primarias de 6 átomos de carbono como mínimo, como hexilamina, octilamina, decilamina, laurilamina y otras aminas derivadas de radicales grasos; fenilalquilaminas, como feniletilamina; alcaloides como brucina; colorantes básicos como toluidina y Azure A; butacaína, procaína y compuestos afines; protamina, polilisina y otros péptidos o proteínas muy básicos. Las aminas primarias que contienen enlaces carbono-carbono insaturados son adecuadas así como las aminas que contienen cadenas ramificadas siempre que la ramificación de la cadena no se produzca demasiado cerca del grupo amino. En este último aspecto, la amina debe contener



1 el grupo orgánico característico:



La cantidad de agente de flotación puede variar entre
amplios límites pero, para obtener los mejores resultados y
por razones de economía, debe mantenerse entre 200 y 1000 g
por 1.000.000 de unidades de heparina en la solución.

El pH de la mezcla se ajusta a 5-7,5 aproximadamente
con ácido acético y a la solución se añaden 2-5 galones por
100 galones de mezcla (2-5 litros por 100 litros) de un lí-
quido orgánico no miscible con agua en el que sea insoluble
el complejo de heparina-amina. Los líquidos adecuados son las
cetonas como metil-isobutil-cetona y etil-amil-cetona; los
ésteres como acetato de etilo y acetato de amilo; los alcoho-
les como alcohol amílico; los disolventes hidrocarbonados co-
mo hexano y benceno; los disolventes clorados como cloroformo
y tetracloruro de carbono.

La mezcla se agita bien y después se deja en reposo du-
rante varias horas o durante la noche. Toda la actividad de
la heparina se encuentra en el precipitado complejo que se
recoge en la interfase entre la fase acuosa y la fase líqui-
da orgánica. El precipitado ocluye parte de la fase acuosa y
parte del líquido orgánico, formando una tercera fase o inter-
fase. La fase acuosa es expulsada y la fase de precipitado
separada de la mayor parte de la fase orgánica restante y tra-
tada con varios volúmenes de un agente rompedor de complejos
seleccionado entre disolventes miscibles en agua en los que
sea insoluble la heparina, como metanol, etanol, isopropanol,
acetona, formamida, dimetilformamida, dioxano, propilenglicol,
los Cellosolves y similares. La mezcla se calienta a unos
70°C, se ajusta el pH a 9,5-12 aproximadamente y se deja sedi-



1 mentar. El complejo de heparina es así descompuesto, pasando
la amina u otro compuesto hidrófobo a solución en el agente
rompedor de complejos, siendo la heparina insoluble. El sólido
húmedo se separa, se lava con metanol o con uno de los di-
5 solventes citados inmediatamente antes, se suspende en agua,
se precipita con metanol o con uno de dichos disolventes y
se recoge a vacío para obtener el producto crudo final. Este
producto, heparina sódica, puede ser purificado de nuevo se-
gún la práctica habitual, preferiblemente por el procedimien-
10 to descrito en la solicitud de patente estadounidense copen-
diente de Bush y colaboradores, número de serie 621.217, pre-
sentada el 9 de Noviembre de 1956 y titulada "Método de puri-
ficación de hidratos de carbono sulfatados".

15 Los siguientes ejemplos específicos son ilustrativos
del procedimiento de esta invención pero se sobreentiende que
el procedimiento no se limita a los mismos:

EJEMPLO 1

20 Se introducen 5000 libras (2268 kg) de intestino de
buey en un reactor de acero inoxidable, provisto de una cami-
sa de agua y vapor de agua termostatzados. Se añaden 200 ga-
lones (757 litros) de agua y 10 galones (38 litros) de cloro-
formo. Se agita la mezcla, se eleva la temperatura a 90°F
(32°C) y se interrumpe la agitación. Se añaden 5 galones (19
litros) de tolueno y se cierra la vasija. La autólisis se pro-
25 sigue durante 17 horas.

30 La solución extrayente, constituida por 30 galones (1135
litros) de ácido acético glacial, 35 galones (132,5 litros)
de amoniaco acuoso al 30 %, a la que se ha añadido hidróxido
sódico al 50 % para ajustar el pH a 9,6 a 80°F (27°C) y agua
hasta 300 galones (1135 litros) se agrega al tejido. Mientras



1 se agita se eleva la temperatura a 60°C y se mantiene en ese
valor durante 2 horas. Entonces se aplica vapor de agua y la
temperatura se eleva hasta la de ebullición. Se añaden 200 li
bras (91 kg) de auxiliar de filtración grosero (perlite) y
5 la mezcla se filtra a través de un filtro a vacío de descarga
por cuerda. La torta se lava con 200 galones (757 litros)
de agua caliente sobre el filtro.

El filtrado se deja en reposo durante la noche y la
grasa se retira de la parte superior. Después de enfriar a
10 100°F (38°C), el filtrado se pasa a un tanque con agua termos
tatizada y la temperatura se fija en 95-100°F (35-38°C). Se
añaden 24 galones (91 litros) del extracto pancreático, pre-
parado como se ha descrito antes, en fracciones de 4 galones
(15 litros) cada 12 horas, durante 3 días. El lote se lleva
15 a ebullición y luego se enfría a la temperatura ambiente.

A continuación se filtra el lote en una vasija y se ana-
liza para determinar su contenido en heparina. Se encuentran
40.000.000 de unidades en 1000 galones (3787 litros) de fil-
trado. Se añaden 20 kg de n-octilamina y se agregan 105 libras
20 (47,5 kg) de ácido acético glacial para llevar el pH a 6,5.
Se añaden 20 galones (76 litros) de metil-isobutil-cetona y
toda la mezcla se agita fuertemente durante una hora. Después
la mezcla se deja en reposo durante la noche. La fase acuosa
transparente se escurre y se despreca. La interfase de color
25 pardo grisáceo se separa entonces junto con una pequeña can-
tidad de la fase cetónica y se pasa a un pequeño calderín.
El volumen de la interfase es de 7 galones (26,5 litros). Se
añaden 30 galones (113,5 litros) de metanol, la mezcla se ca-
lienta a 120°F (49°C) y después se ajusta el pH a 9,0. Enton
30 ces se deja la mezcla en reposo durante la noche. El sólido se



1 recoge a vacío y se lava con 5 galones (19 litros) de metanol.
Después la torta se suspende en 5 galones (19 litros) de agua
y la heparina se precipita con 10 galones (38 litros) de me-
tanol. El sólido se recoge a vacío. El peso seco de la torta
5 es de 1000 g y las unidades totales son 38.000.000.

EJEMPLO 2

En una vasija de reacción equipada de agua y vapor de
agua termostatizados se introducen 3000 libras (1361 kg) de
pulmón de buey picado junto con 30 libras (13,6 kg) de pán-
creas de buey picado. Se añaden 120 galones (454 litros) de
10 agua y 6 galones (23 litros) de cloroformo. La temperatura
se lleva a 95°F (35°C) con agitación. Se añaden 3 galones
(11,3 litros) de tolueno, después se interrumpe la agitación
y la mezcla se autoliza durante 18 horas.

15 Se añaden 300 galones (1135 litros) de solución extra-
yente preparada como en el Ejemplo 1 y la temperatura se ele-
va a 130°F (54°C) y se mantiene en ese valor durante 2 horas.
Después la temperatura se eleva a 200°F (93°C) y la mezcla
20 se filtra en un filtro de descarga a resorte con 150 libras
(68 kg) de auxiliar de filtración grosero. (perlite).

El filtrado (450 galones, 1703 litros) se enfría a
100°F (38°C) y se mantiene en una vasija termostatizada a
100°F (38°C). Se añade el extracto pancreático en porciones
de 3 galones (11,3 litros) cada 12 horas, durante 3 días. Des-
25 pués la mezcla se lleva a ebullición y a continuación se en-
fría. Se filtra la solución y se determina su actividad. Se
encuentran 36.000.000 de unidades. Se añaden 18 kg de n-octil-
amina y el pH se ajusta a 6,5 con 100 libras (45 kg) de ácido
acético glacial. Se añaden 15 galones (57 litros) de metil-
30 isobutil-cetona y la mezcla se agita vigorosamente durante

Nº 441.815

1 una hora.

5 Se separa el líquido transparente y la interfase oscura se pasa a un pequeño calderín provisto de elementos de calefacción y agitación. El volumen es de 6 galones (23 litros). Se añaden 25 galones (95 litros) de metanol y la mezcla se calienta a 120º F (49º C). Se retira el calor, se ajusta el pH a 9,0 con hidróxido sódico concentrado y la mezcla se deja en reposo durante la noche. El sólido que se sedimenta se recoge a vacío. La torta se suspende de nuevo en 5 galones (19 litros) de agua y se vuelve a precipitar con 10 galones (38 litros) de metanol. El sólido se recoge a vacío. El peso seco es de 1000 g.; La actividad es de 34.000.000 de unidades.

15 Habiendo descrito por completo la invención, se sobreentiende que no deseamos quedar limitados a los detalles establecidos sino que la invención tiene todo el alcance de las reivindicaciones del apéndice.

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

20 REIVINDICACIONES

25 1.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HEPARINA, que incluye la autólisis del tejido animal, la extracción alcalina del autolizado para formar un extracto acuoso que contiene heparina, y la digestión de dicho extracto con enzimas agregados, caracterizado por las operaciones que consisten en agregar al extracto digerido un agente de flotación constituido por una sustancia orgánica básica capaz de formar con la heparina contenida en dicho extracto un complejo de heparina hidrófobo opcionalmente ajustar el pH entre 5 y 7,5 aproximadamente, añadir al

6
30

1 complejo así formado un líquido orgánico no miscible con
agua en el que sea insoluble el complejo de heparina, agi-
tar la mezcla y dejarla en reposo durante un periodo de
tiempo suficiente para permitir la formación de tres ca-
5 pas constituídas por una fase acuosa, una fase líquida or-
gánica y una interfase de dicho complejo de heparina, se-
parar mecánicamente dicha interfase de las otras fases y
separar la heparina de dicha interfase.

10 2.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HE-
PARINA, según la reivindicación 1ª caracterizado porque
comprende la operación que consiste en añadir al extracto
digerido una amina primaria que contiene como mínimo 6
átomos de carbono y comprende el grupo orgánico $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
 NH_2 para formar un complejo hidrófobo de heparina.

15 3.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HE-
PARINA, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque
consiste en añadir al extracto digerido octilamina para
formar un complejo de heparina hidrófobo y añadir al com-
plejo así formado metil-isobutil-cetona.

20 4.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HE-
PARINA, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque
trás separar mecánicamente la interfase de las otras fa-
ses se agrega a dicho complejo de heparina un disolvente
miscible con agua en el que la heparina sea insoluble y
25 en el que el agente de flotación sea soluble para descom-
poner el complejo y separar mecánicamente la heparina como
forma insoluble de la mezcla.

30 5.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HE-
PARINA, según las reivindicaciones 1ª y 3ª, caracterizado
porque se agrega al complejo hidrófobo metil-isobutil-ce-

1 tona y se agita la mezcla dejándola en reposo durante un
periodo de tiempo suficiente para permitir la formación
de tres capas constituidas por una fase acuosa, una fase
5 líquida orgánica y una interfase de dicho complejo de hepa-
rina, separando mecánicamente dicha interfase de las otras
fases y añadiendo un agente rompedor del complejo que com-
prende metanol a dicho complejo de heparina y separando me-
cánicamente la heparina como forma insoluble de la mezcla

10 6.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HE-
PARINA, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque
el tejido animal es pulmón de buey y se autoliza en pre-
sencia de un enzima proteolítico, extrayendo el autolizado
con un agente de extracción acuoso alcalino para formar
un extracto acuoso que contiene heparina con enzimas agre-
15 gados.

20 7.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HE-
PARINA, según la reivindicación 6ª, caracterizado porque
el agente de extracción es una solución acuosa de hidróxi-
do sódico y acetato amónico a un pH comprendido aproxima-
damente entre 8 y 10 formando así un extracto acuoso que
contiene heparina; digeriéndose dicho extracto en presen-
cia de un enzima proteolítico, y después añadir al extrac-
to digerido de 200 a 1000 g de octilamina por cada
25 1.000.000 de unidades de heparina contenidas en el extrac-
to, ajustando el pH entre 5 y 7,5 aproximadamente y agre-
gar a la mezcla así formada alrededor de 2-5- galones por
100 galones de mezcla (2-5 litros por 100 litros de mezcla)
de metil-isobutil-cetona, agitar la mezcla y dejarla en re-
poso durante un periodo de tiempo suficiente para permitir
la formación de tres capas constituidas por una fase acuo-

 30

1

sa, una fase líquida orgánica y una interfase que contiene dicho complejo de heparina, separar mecánicamente dicha interfase de las otras fases, agregar varios volúmenes de metanol a dicho complejo de heparina, calentar la mezcla así formada, ajustar el pH de la mezcla entre 9,5 y 12 aproximadamente y separar mecánicamente la heparina como forma insoluble de la mezcla.

5

10

8.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HEPARINA, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque comprende operaciones que consisten en añadir a un extracto de heparina una amina primaria de 6 átomos de carbono como mínimo y conteniendo el grupo orgánico $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ para formar un complejo hidrófobo de heparina, ajustar el pH entre 5 y 7,5 aproximadamente, añadir al complejo así formado un líquido orgánico no miscible con agua en el que sea insoluble el complejo de heparina, agitar la mezcla y dejarla en reposo durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de tres capas constituidas por una fase acuosa, una fase líquida orgánica y una interfase de dicho complejo de heparina, separar mecánicamente dicha interfase de las otras fases y separar la heparina de dicha interfase.

15

20

25

9.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HEPARINA, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque comprende operaciones que consisten en añadir octilamina a un extracto de heparina para formar un complejo hidrófobo de heparina, ajustar el pH entre 5 y 7,5 aproximadamente, añadir a la mezcla así formada metil-isobutil-cetona, agitar el complejo y dejarlo en reposo durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de tres

6 30

1

capas contituídas por una fase acuosa, una fase líquida orgánica y una interfase de dicho complejo de heparina, separar mecánicamente dicha interfase de las otras fases y separar la heparina de dicha interfase.

5

10.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HEPARINA.

10

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

Madrid, 15 octubre 1.975

BERNARDO UNGRIA

P.P.



15

20

25

30