



1673

441854

Int. Cl.² E08B

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INTRODUCCION

SOLICITANTE: LABORATORIOS LEO, S.A.

RESIDENCIA: Avd. Pío XII 99- MADRID

ENUNCIADO: PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COM-
PLEJO DE HEPARINA INSOLUBLE EN AGUA DE
UN EXTRACTO ACUCOSO ANIMAL QUE CONTIENE
HEPARINA

Prioridad: Patente n.º del

**POOR
QUALITY**



1

Esta invención se refiere a la manufactura de heparina. Más especialmente, se refiere a un nuevo procedimiento de aislamiento de la heparina a partir de un tejido animal.

5

La recuperación de la heparina de los tejidos animales es un procedimiento largo y costoso que emplea muchas horas y numerosos materiales. En la mayoría de los casos, los métodos de recuperación requieren una etapa de autólisis y digestión para separar la heparina de un complejo de protefina-heparina obtenido a partir de tejidos animales. La autólisis completa dura aproximadamente 24 horas mientras que la etapa de digestión requiere de 48 a 72 horas. Son necesarios otros procedimientos molestos de purificación para obtener una heparina de gran potencia. La combinación de tiempo y materiales consumidos hace que la recuperación de heparina por estos métodos resulte cara y, por consiguiente, el precio de coste de la heparina es elevado.

10

15

20

25

La preparación de extractos conteniendo heparina ha sido descrita en diversos artículos tales como el de Howell (American Journal of Physiology, 63, 434, 1922), Charles and Scott (Journal of Biological Chemistry 102, 25, 1933), Kuizenga y Spaulding (Journal of Biological Chemistry, 148, 641, 1941) y otros. El aislamiento de la heparina del extracto que la contiene es una operación todavía más complicada y comprometida que la preparación del extracto y requiere considerables cantidades de tiempo y equipo.

30

Algunas de las referencias más recientes mencionan el hecho de que la heparina puede ser precipitada de una solución acuosa con cantidades relativamente grandes de sales de amonio cuaternarias. Estas sales forman con la heparina un complejo insoluble en agua del que puede ser liberada fácilmente la



1 heparina. Sin embargo, desgraciadamente, este método es de
poca utilidad en la separación de la heparina de un extracto
de tejido animal que contenga otros materiales animales como
proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, sales, etc, ya
5 que algunos de estos materiales también forman complejos in-
solubles con la sal de amonio cuaternaria.

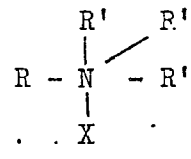
Un objeto de esta invención es proporcionar un proce-
dimiento para precipitar selectivamente un complejo de hepa-
rina insoluble en agua directamente de un extracto que con-
10 tenga heparina y así eliminar la digestión previa de las pro-
teínas. También un objeto de esta invención es proporcionar
un procedimiento simplificado para la recuperación de un com-
plejo de heparina insoluble en agua a partir de un extracto
de tejido animal que contenga heparina y otros componentes
15 tisulares animales solubles en agua. Otro objeto de esta in-
vención es proporcionar un procedimiento que produzca hepari-
na de gran potencia con elevados rendimientos en un periodo
de pocas horas. Todavía otro objeto es la formación de un
complejo insoluble en agua del que pueda ser aislado fácil-
20 mente la heparina.

Estos y otros objetos pueden ser conseguidos tratan-
do un extracto acuoso de tejido animal que contenga heparina
con una cantidad específica de una sal de amonio cuaternaria
soluble en agua, como la definida más adelante. La sal de amo-
25 nio cuaternaria forma con la heparina en el extracto acuoso
del tejido animal un complejo insoluble que puede ser fácil-
mente aislado cuando se emplea la cantidad apropiada de sal
de amonio cuaternaria. El complejo insoluble en agua así for-
30 mado puede ser descompuesto fácilmente en sus componentes y
la heparina libre aislada con altos rendimientos y excelente

451

1 potencia.

Las sales de amonio cuaternarias solubles en agua útiles para precipitar un complejo insoluble en agua con la heparina pueden seleccionarse entre un grupo de materiales caracterizados por la fórmula:



10 donde X puede ser cualquier anión que no haga a la sal insoluble en agua, v.g. cloruro, bromuro, sulfato, etc y R es una cadena hidrocarbonada alifática de 8 átomos de carbono como mínimo que puede formar parte de un sistema heterocíclico junto con otros radicales R', estando interrumpidas opcionalmente dichas cadenas hidrocarbonadas por oxígeno, dobles enlaces, 15 nitrógeno y anillos aromáticos y donde los radicales R' están seleccionados entre el grupo formado por alquilo inferior de 1 a 7 átomos de carbono, aralquilo, alquenilo, alcoxi, polialcoxi y cloroalquilo. El término "soluble en agua" en el sentido utilizado en esta memoria y en las reivindicaciones se refiere a una solubilidad de la sal amónica del 2 % como mínimo (en peso/volumen) en agua a 40°C. Este requisito establece automáticamente el límite superior a la longitud de la cadena de carbonos ya que alargando los radicales alquilo del átomo de nitrógeno cuaternizado, las sales de amonio 25 cuaternarias se vuelven menos solubles en agua.

Con objeto de ilustrar mejor las diversas sales amónicas cuaternarias útiles en el procedimiento de esta invención, remitimos a la Tabla I. Esta tabla contiene, en columnas distintas, los diversos radicales del átomo de nitrógeno cuaternizado; cuando se cita un radical divalente o trivalente, es- 30

1 te radical está ocupando dos o tres valencias de los átomos
de nitrógeno y por lo tanto significa un anillo heterocí-
clico. Debe entenderse que esta tabla ilustra alguno de los
5 compuestos amónicos cuaternarios comprendidos dentro de los
límites de la definición anterior y que otros compuestos si-
milares son igualmente adecuados.

La columna de "peso molecular" de la Tabla I se refie-
re a los pesos moleculares de los cationes de la sal amónica
cuaternaria particular. Se observará rápidamente que estos
10 pesos moleculares de los cationes están todos ellos compren-
didos entre 172 y alrededor de 450.

La característica esencial de esta invención es la pre-
cipitación selectiva de la heparina como complejo insoluble
en agua. Debido a la variedad de sales amónicas cuaternarias
15 que precipitan la heparina y debido a los diversos tipos y
cantidades de otros compuestos que puede haber presentes en
el extracto animal que contiene la heparina, no puede darse
una gama universal de cantidades de sal amónica cuaternaria
a utilizar. Sin embargo, una vez que un extracto de tejido
20 animal dado es analizado y se selecciona la sal de amonio cua-
ternaria a utilizar, la cantidad de esta sal de amonio cuater-
naria para precipitar la heparina sin precipitar otros mate-
riales en el extracto puede ser fácilmente determinada. Estos
resultados son totalmente reproducibles.

25 La cantidad mínima de la sal de amonio cuaternaria que
es necesaria para precipitar la heparina en el extracto ani-
mal puede ser determinada fácilmente por valoración, es de-
cir, se añade una solución de la sal de amonio cuaternaria
30 lentamente al extracto de tejido animal que contiene la hepa-
rina hasta que aparece un precipitado.



TABLA I

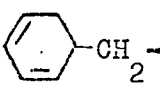
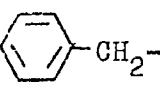
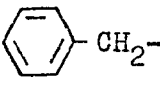
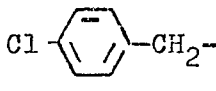
Salas de amonio cuaternarias

	R	R'(1)	R'(2)	R'(3)	Peso molecular
1					
5	-C ₈ H ₁₇ -C ₁₂ H ₂₅ -C ₁₆ H ₃₃ -C ₁₈ H ₃₇ -C ₁₈ H ₃₅ -C ₂₂ H ₄₅ -C ₂₄ H ₄₉ -C(C ₁₇ H ₃₃)=N-CH ₂ -CH ₂ -	-CH ₃ -CH ₃ -CH ₃ -CH ₃ -CH ₃ -CH ₃ -CH ₃ -CH ₃	-CH ₃ -CH ₃ -CH ₃ -CH ₃ -(CH ₂) ₂ OH -CH ₃ -CH ₃ -(CH ₂) ₂ OH	-CH ₃ -CH ₃ -CH ₃ -CH ₃ -(CH ₂) ₂ OH -CH ₃ -CH ₃ -(CH ₂) ₄ Cl	172 228 284 312 370 368 396 441,5
10					
15	-C ₁₂ H ₂₅		-CH ₃	-CH ₃	304
20	-C ₁₆ H ₃₃ 		-CH ₃	-CH ₃	360
25			-CH ₃	-CH ₃	412
			-CH ₃	-CH ₃	446,5
		-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	290

1

TABLA I

Sales de amonio cuaternarias

	R	R'(1)	
	-C ₈ H ₁₇	-CH ₃	-CH ₃
5	-C ₁₂ H ₂₅	-CH ₃	-CH ₃
	-C ₁₆ H ₃₃	-CH ₃	-CH ₃
	-C ₁₈ H ₃₇	-CH ₃	-CH ₃
	-C ₁₈ H ₃₅	-CH ₃	-(CH ₃)
10	-C ₂₂ H ₄₅	-CH ₃	-CH ₃
	-C ₂₄ H ₄₉	-CH ₃	-CH ₃
	-C(C ₁₇ H ₃₃)=N-CH ₂ -CH ₂ -		-(CH ₃)
	-C ₁₂ H ₂₅		-CH ₃
15	-C ₁₆ H ₃₃		-CH ₃
20	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{C}_6\text{H}_4 - (\text{OC}_2\text{H}_4)_2^- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} $		-CH ₃
	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{C}_6\text{H}_4 - (\text{OC}_2\text{H}_4)_2^- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} $		-CH ₃
25	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}_9\text{H}_{19} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2^- \end{array} $	-CH ₃	-CH ₃

30



TABLA I

Salas de amonio cuaternarias

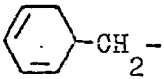
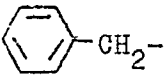
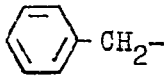
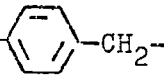
R'(1)	R'(2)	R'(3)	Peso molecular
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	172
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	228
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	284
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	312
-CH ₃	-(CH ₂) ₂ OH	-(CH ₂) ₂ OH	370
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	368
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	396
	-(CH ₂) ₂ OH	-(CH ₂) ₄ Cl	441,5
	-CH ₃	-CH ₃	304
	-CH ₃	-CH ₃	360
	-CH ₃	-CH ₃	412
	-CH ₃	-CH ₃	446,5
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	290



TABLA I (continuación)

	R	R'(1)	R'(2)	R'(3)	Peso molecular
1					
5	$\text{C}_{15}\text{H}_{31}$ $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	374
	$-\text{C}_{16}\text{H}_{31}$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	$-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ $-\text{CH}_3$	304 282
10	$-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ 	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	332
	$-\text{C}_6\text{H}_{13}$ 	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	226
15					
20					
25					
30					

1

TABLA I (continuación)

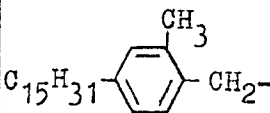
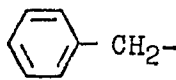


	R	R'(1)	R'(2)
5		-CH ₃	-CH ₃
	=CH-CH=CH-CH=CH-		
	-C ₁₆ H ₃₁	-CH ₃	-CH ₃
10	-C ₁₄ H ₂₉		-CH ₃
	-C ₆ H ₁₃ 	-CH ₃	-CH ₃
15			
20			
25			
30			



TABLA I (continuación)

R'(1)	R'(2)	R'(3)	Peso molecular
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	374
-CH ₃	-CH ₃	-C ₁₆ H ₃₃	304
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	282
 -CH ₂ -	-CH ₃	-CH ₃	332
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	226



1 Para determinar la cantidad máxima de sal de amonio
cuaternaria permisible para producir una heparina de gran
potencia, se prosigue la valoración anterior y se separa el
precipitado después de nuevas adiciones de solución de sal
5 de amonio cuaternaria. Se observará que poco después de obte-
ner el primer precipitado y continuar la valoración, con
nuevas adiciones de sal amónica la cantidad de precipitado
permanece prácticamente constante. Sin embargo, a medida que
10 prosigue la valoración, se alcanza un punto en el que se ob-
serva de nuevo un aumento de la precipitación. Este marca-
do aumento del precipitado es el punto final de la valora-
ción, siendo el exceso de precipitado un complejo de sal
amónica con otros componentes del extracto de tejido animal.
15 Por lo tanto, los límites efectivos de la cantidad de sal
de amonio cuaternaria que precipita el complejo de heparina
son establecidos por este sencillo ensayo y la cantidad a
utilizar puede ser seleccionada en cualquier punto situado
entre estos límites. La curva obtenida representando la can-
20 tidad de precipitado en función de la cantidad de sal de amo-
nio cuaternaria agregada se encuentra en el dibujo del apén-
dice.

Haciendo referencia a este dibujo, los límites ante-
25 riores están indicados como puntos 11 y 12, mostrando la línea
que los une la cantidad de precipitado 13 obtenida por adi-
ción de cantidades adicionales de sal de amonio cuaternaria
14. Este diagrama muestra claramente la diferencia de solubi-
lidad de los complejos de los diversos componentes del ex-
tracto animal. También muestra que, cuando la cantidad de
30 sal amónica utilizada para precipitar la heparina está solo
ligeramente por encima del punto de insolubilidad 11, no to-



1 da la heparina contenida en el extracto es precipitada. Al
aproximarse al punto 12 en la curva, la heparina es precipita
5 da cuantitativamente y los mejores resultados se obtienen ope
rando con una cantidad muy próxima a 12'. La pendiente de la
5 curva después de 12 está estilísticamente exagerada y experi-
mentalmente se encontrará que es menos pronunciada.

Como ya se ha mencionado, el diagrama varía algo de
acuerdo con el extracto animal que se utiliza y también de
acuerdo con la sal de amonio cuaternaria seleccionada. Según
10 las características de solubilidad del complejo de heparina
en el medio particular, la curva puede desplazarse con res-
pecto a los ejes, aunque la forma de la curva permanece prác-
ticamente igual independientemente de la sal amónica y del
15 extracto de tejido utilizados. Para los expertos en la técni-
ca resultará evidente que una vez establecida, la curva para
un extracto animal dado con una sal amónica dada permanecerá
casi idéntica cuando se utiliza una sal amónica similar, que
se diferencie por ejemplo en un grupo metileno o etileno, so-
20 bre el mismo extracto animal. Esto resulta evidente de las
características de solubilidad de los complejos formados: los
complejos que difieren solamente en un grado tan pequeño tie-
nen solubilidades muy similares en medios idénticos. En gene-
ral, puede decirse que la cantidad de sal de amonio cuaterna-
25 ria necesaria para la precipitación de heparina de gran poten-
cia con buenos rendimientos oscila aproximadamente entre 5
y 50 milimoles por cada 100.000 unidades de heparina. Esta
cantidad es muy superior a la cantidad estequiométrica, inclu-
so si se cuenta un mol de sal de amonio cuaternaria por cada
30 grupo ácido sulfónico y por cada grupo ácido carboxílico en
la molécula de heparina.



1
5
10
15
20
25
30

El procedimiento simplificado de esta invención consiste por lo tanto en agregar al extracto acuoso de tejido animal que contiene heparina una cantidad suficiente de una sal de amonio cuaternaria para precipitar prácticamente toda la heparina pero insuficiente para precipitar otros componentes animales presentes, aislar el complejo de heparina insoluble en agua, redissolver el complejo aislado en una solución salina y precipitar la heparina libre con un disolvente orgánico miscible con agua, como acetona, dioxano, alcanoles y similares. Se obtiene así un gran rendimiento de heparina aislada con una potencia excelente. Esta elevada potencia es la característica principal de este procedimiento. Cuando se precipita heparina cruda de los extractos de tejidos animales de acuerdo con métodos de la técnica anterior, se obtiene una potencia comprendida entre 10 y 80 unidades/mg, en la mayoría de los casos considerablemente por debajo de 50 unidades/mg y entonces tiene que ser elaborada mediante complicados métodos de purificación hasta conseguir una potencia superior a 120 unidades/mg. La potencia del material obtenido por el procedimiento de esta invención es normalmente superior a 100 unidades/mg y en la mayoría de los casos superior a 120 unidades/mg, eliminando así las diversas operaciones de purificación inevitables cuando se utilizan métodos que producen heparina de menor potencia.

La ventaja principal del procedimiento de esta invención es su selectividad en la precipitación de la heparina y solamente heparina. Agregando la cantidad calculada o predeterminada de sales de amonio cuaternarias, precipita toda la heparina mientras que los otros materiales menos aniónicos quedan en solución. La heparina está más firmemente combinada



1 en un complejo de amonio cuaternario que en el complejo de
proteína/heparina del tejido animal. Por lo tanto, la sal
5 cuaternaria desplaza a la proteína de los centros aniónicos
de la heparina. Esta elevada basicidad de los complejos de
amonio cuaternario los hace más eficaces que otros compuestos
cатиónicos para separar la heparina del complejo con proteína.
Además, como el complejo amonio cuaternario/heparina es un
complejo del tipo ácido fuerte/base fuerte, la formación del
10 complejo se produce eficazmente dentro de un intervalo muy
amplio de pH. Además, la selectividad del agente complejante
de la sal de amonio cuaternaria es independiente del tejido
y de la especie animal y actúa eficazmente con cualquier ex-
tracto tisular que contenga heparina en solución acuosa.

15 En una realización de esta invención, el extracto con-
teniendo heparina se prepara dispersando en agua los tejidos
animales que se sabe que contienen un porcentaje relativamente
alto de heparina. A esta suspensión se añade sulfato sódico
e hidróxido sódico suficiente para llevar el pH a 11,5. Des-
20 pués la mezcla se calienta durante hora y media a 50°C y se
agrega sulfato de aluminio. Después la mezcla se ajusta a pH
7-8, se calienta por encima de 90°C y se filtra, preferiblemen-
te empleando un auxiliar de filtración. El filtrado contiene
prácticamente la totalidad de la heparina originalmente pre-
25 sente en la fuente animal. Naturalmente, si se desea, pueden
realizarse operaciones de autólisis y/o digestión antes de la
precipitación selectiva de la heparina pero estas operacio-
nes no presentan ninguna ventaja particular.

30 Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar la inven-
ción pero debe entenderse que no la limitan en modo alguno.
En estos ejemplos, la expresión u/libra significa "unidades



de heparina por libra de tejido húmedo de partida", salvo indicación en contrario.

EJEMPLO 1

A 3200 libras (1451 kg) de una suspensión acuosa de mucosa intestinal de cerdo (al 10 % de sólidos) se añaden 150 galones (568 litros) de agua, 400 libras (181 kg) de sulfato sódico y sosa cáustica al 50 % suficiente para dar a la mezcla un pH de 11,5. La mezcla se calienta durante hora y media a 50°C después de lo cual se añaden 100 libras (45 kg) de sulfato de aluminio. Se agrega ácido sulfúrico para ajustar la mezcla a un pH de 7,5, seguido de la adición de 150 libras (63 kg) de auxiliar de filtración. La mezcla resultante se calienta por inyección de vapor de agua hasta 95°C y se filtra. La torta del filtro se lava con agua caliente. El filtrado y las aguas de lavado combinados tienen un volumen de unos 500 galones (1893 litros) conteniendo 18,9 unidades/cc (11.200 u/libra, 24.713 u/kg) de actividad de heparina.

Esta solución se trata con 7,7 libras (3,5 kg) de una solución al 50 % de Arquad 16 (vendido por Armour and Co.) en alcohol isopropílico donde los componentes activos son 90 % de cloruro de hexadeciltrimetilamonio, 6 % de cloruro de octadeciltrimetilamonio y 4 % de cloruro de octadeceniltrimetilamonio, seguido de la adición de 8 libras (3,6 kg) de auxiliar de filtración. La mezcla resultante se agita durante una hora aproximadamente, se filtra y el sólido obtenido se lava bien con agua a unos 60°C. El sólido se extrae dos veces con 8 galones (30 litros) cada vez de solución de cloruro sódico 2N a 60°C, que ha sido previamente ajustada a pH 4 con ácido acético. La heparina cruda precipita de la solución salina por adición de 0,8 volúmenes por ciento de alco



1 hol 3A. La heparina aislada se recupera con un rendimiento
de 9500 u/libra (20.944 u/kg), conteniendo 160 u/mg, activi-
dad específica muy superior a la de cualquier heparina cru-
da anteriormente obtenida.

5 Sustituyendo la anterior solución de sales de amonio
cuaternarias al 50 % en alcohol isopropílico por una solu-
ción acuosa al 25 % que contiene las mismas cantidades de
ingredientes activos, se obtiene el mismo resultado.

EJEMPLO 2

10 Una suspensión acuosa de 850 libras (385 kg) de mucosa
intestinal de cerdo (al 10 % de sólidos) se procesa como
en el Ejemplo 1 para producir una combinación de filtrado y
aguas de lavado con un volumen de 170 galones (643 litros)
de solución de extracto, que contiene 17,9 u/cc de heparina
15 (3600 u/libra, 29.983 u/kg).

A este extracto se añaden 5 galones (19 litros) de me-
til-isobutil-cetona y la solución se deja en reposo durante
la noche. La fase líquida inferior transparente resultante se
trata con 640 cc de una solución al 50 % de alcohol isopro-
pílico donde los componentes activos están constituidos por
20 90 % de cloruro de hexadeciltrimetilamonio, 6 % de cloruro de
octadeciltrimetilamonio y 4 % de cloruro de octadeciltrimetil-
amonio, seguido de la adición de 2,5 galones (9,5 litros) de
metil-isobutil-cetona. Un complejo de heparina que entonces
flota sobre la superficie es separado retirando el líquido
situado debajo. El complejo se lava con agua, se disuelve en
25 15 litros de cloruro sódico 2N a 60°C, se filtra y se preci-
pita con 0,7 volúmenes por ciento de alcohol 3A. La heparina
aislada se recupera con un rendimiento de 11.000 u/libra
30 (24.250 u/kg), dando por análisis 150 u/mg.



EJEMPLO 3

1 En este ejemplo, unas porciones de un extracto obteni-
do en la forma descrita en el Ejemplo 1 se tratan con diver-
sas cantidades de varias sales de amonio cuaternarias y mez-
5 clas de las mismas y después se procesan como en los ejem-
plos anteriores. Se analiza el contenido original de hepari-
na en el extracto y se compara con los rendimientos de hepari-
na cruda obtenidos después de formar el complejo, redissolver
y reprecipitar en la forma descrita en el Ejemplo 1. Los ren-
10 dimientos se expresan en porcentajes, calculados sobre el con-
tenido original de heparina en el extracto y, en una columna
distinta, la potencia de la heparina cruda viene dada en
u/mg.

15 Las sales ilustradas en la Tabla II son todas productos
comerciales que contienen por lo menos un 90 % de los com-
puestos citados. El 0-10 % restante está constituido por com-
puestos similares, que difieren de los mencionados en la lis-
ta en un grupo metileno, un doble enlace o un isomerismo menor.

20 Los pesos moleculares dados en la Tabla II son solamen-
te para los cationes. Los aniones no se tienen en cuenta ya
que no participan en la reacción de formación de complejo.
Otros aniones que sustituyan al cloro anterior producirán re-
sultados idénticos siempre que las sales cumplan los requisi-
25 tos de solubilidad. Naturalmente, en la segunda columna los
"moles/10⁸ unidades" se basan en los pesos moleculares de
las sales. Los resultados indicados más adelante demuestran
que, aumentando la cantidad de agente complejante para preci-
pitar la heparina, se obtienen rendimientos más altos y que
30 cuando el agente complejante se agrega en cantidad excesiva,
disminuye la potencia de la heparina cruda. Naturalmente, la



1 potencia de la heparina cruda debe ser lo más alta posible
 aunque aumentará en las etapas de purificación posteriores.
 Determinando los límites efectivos de adición de la sal de
 5 amonio cuaternaria en la forma antes descrita, este procedi-
 miento producirá siempre heparina cruda con una potencia su-
 perior a 90 unidades por miligramo, que es la potencia prácti-
 ca mínima para que este procedimiento resulte económicamente
 atractivo. La potencia es determinada por el procedimiento
 10 normalizado descrito en la farmacopea de Estados Unidos. La
 potencia mínima de los preparados farmacéuticos requiere 120
 unidades por miligramo de heparina.

TABLA II

Rendimiento y potencia de heparina con sales de amonio cuater-
 narias seleccionadas

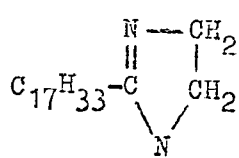
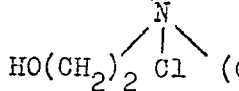
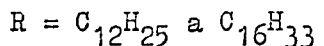
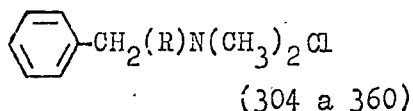
Sal amónica (peso molecular)	Cantidad añ dida en moles/ 10 ⁶ unidades	Potencia, unidades farmacopea de EE.UU.	Rendi- mien- to, %
C ₁₆ H ₃₃ N(CH ₃) ₃ Cl (284)	5,7	133	17,1
C ₁₆ H ₃₃ N(CH ₃) ₃ Cl (284)	11,4	118	79,4
20 C ₁₆ H ₃₃ N(CH ₃) ₃ Cl (284)	22,8	104	91,2
C ₁₆ H ₃₃ N(CH ₃) ₃ Cl (284)	45,6	84,4	87,5
C ₁₂ H ₂₅ N(CH ₃) ₃ Cl (228)	12	129	60
C ₁₂ H ₂₅ N(CH ₃) ₃ Cl (228)	18	118	84
C ₁₂ H ₂₅ N(CH ₃) ₃ Cl (228)	24	97,1	84
25 C ₁₈ H ₃₇ N(CH ₃) ₃ Cl (312)	12,4	138	94
C ₁₈ H ₃₇ N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂ (CH ₃)Cl (372)	12,4	142	98
 (466)	6,3	142	57
C ₁₇ H ₃₃ N(CH ₃) ₃ Cl (312)	12,6	104	71
	21	95	75
30 HO(CH ₂) ₂ Cl (CH ₂) ₄ Cl	31,4	28	66



TABLA II (continuación)

Sal amónica (peso molecular)	Cantidad añada en moles/ 10 ⁸ unidades	Potencia, unidades farmacopea de EE.UU.	Rendimiento, %
------------------------------	--	---	----------------

5

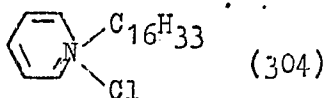


12,5

127

47

10



8,8

92

82

15

20

25

30

En la tabla anterior se observa también que, para obtener un precipitado de heparina con una potencia superior a 90 u/mg con cloruro de hexadeciltrimetilamonio, se emplean menos de 37,5 moles de la sal por 10⁸ unidades de heparina. Este valor es fácilmente determinado representando los rendimientos antes indicados en función de las cantidades de sal utilizada. La curva así establecida desciende por debajo de las 90 u/mg de potencia a 37,5 moles/10⁸ unidades de heparina. El intervalo más económico de operación para esta sal amónica está comprendido, por lo tanto, aproximadamente entre 12 y 37,5 moles de la sal por 10⁸ unidades de heparina, estando determinado el límite inferior por el rendimiento. Empleando cloruro de octadeciltrimetilamonio en lugar de la sal de amonio cuaternaria anterior, esta curva desciende por debajo de las 90 u/mg de potencia para una cantidad de sal complejante menor, debido a la menor solubilidad del complejo formado en el medio acuoso. Por lo tanto, el mejor intervalo operativo es alrededor de 10 a 35 moles de sal por 10⁸ unidades de heparina. Las sales amónicas que contienen cadenas al-

1 quílicas más cortas requieren cantidades algo mayores ya que
sus complejos con heparina son más solubles. Estos límites
superiores solamente cambian en pequeñas cantidades cuando
5 las sales de amonio cuaternarias difieren solamente en un gru-
po etileno o un doble enlace. Sin embargo, cuando se utili-
za una sal amónica cuaternaria heterocíclica, la solubilidad
del complejo varía considerablemente y se observarán límites
diferentes.

10 Como ya se ha indicado, la fuente del extracto de he-
parina carece de importancia ya que en el extracto se de-
termina el contenido de heparina antes de la precipitación
selectiva del complejo de heparina con las sales de amonio
cuaternarias. Entre los tejidos animales que pueden ser uti-
lizados para la preparación del extracto de heparina se en-
15 encuentran los intestinos delgados de buey, el pulmón de buey,
el duodeno de cerdo, el hígado de cerdo, la mucosa intestinal
de cerdo, el hígado de perro, etc.

20 La invención puede ser practicada en cualquiera de las
numerosas formas que esta descripción sugerirá al experto en
la técnica. Todas estas prácticas de la invención se conside-
ran como parte de la misma siempre que se encuentren dentro
de los límites de las reivindicaciones del apéndice.

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

REIVINDICACIONES

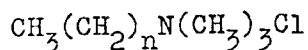
1. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HE-
PARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE -
CONTIENE HEPARINA, esencialmente caracterizado porque compren-
de las operaciones que consisten en tratar una suspensión -
acuosa de tejido animal que contiene heparina con sulfato só

1 dico a un pH de 11,5; calentar dicha mezcla a 50°C; agregar
sulfato de aluminio; ajustar el pH a 7-8; filtrar la mezcla
a más de 90°C; tratar el filtrado con una sal de amonio cua-
ternaria soluble en agua, con una solubilidad del 2 % como
5 mínimo en agua y conteniendo un radical hidrocarbonado de 8
átomos de carbono como mínimo sobre el nitrógeno, siendo uti-
lizada dicha sal amónica en una proporción de 10 a 30 moles
por cada 10⁸ unidades de heparina, formando un complejo inso-
luble con dicha sal de amonio cuaternaria; aislar el comple-
10 jo de heparina insoluble en agua formado; disolver dicho com-
plejo en una solución salina y recuperar la heparina del mismo,
y caracterizado también porque se agrega una sal de amonio -
cuaternaria que se disuelve en agua en una proporción del -
2 % como mínimo y en la que una de las valencias del átomo -
15 de nitrógeno contiene una cadena hidrocarbonada esencialmen-
te alifática de 8 átomos de carbono como mínimo, siendo agre-
gado dicho compuesto en una proporción de 10 a 30 moles por
cada 10⁸ unidades de heparina.

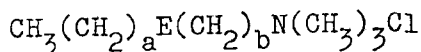
2. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HE-
20 PARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE -
CONTIENE HEPARINA según la Reivindicación 1, caracterizado -
porque la sal amónica soluble en agua es agregada en forma -
de solución en un disolvente orgánico.

3. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HE-
25 PARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE -
CONTIENE HEPARINA según la reivindicación 1, caracterizado -
porque el compuesto de amonio cuaternario soluble en agua en
una proporción del 2 % como mínimo, esta representado por la
fórmula $RN(CH_2)_3Cl$, donde R es una cadena hidrocarbonada ali-
30 fática de 8 átomos de carbono como mínimo.

1 4. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HEPARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE -
CONTIENE HEPARINA, según la Reivindicación 1, caracterizado
porque la sal de amonio cuaternaria es una mezcla constituída
5 por un 50 % como mínimo de

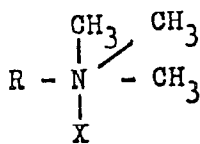


donde n representa un número entero que vale 7 como mínimo,
estando representado el resto por la fórmula:



10 donde a y b son números enteros y la suma de a y b es 5 como
mínimo y donde E está seleccionado entre el grupo formado por
los radicales divalentes $-\text{CH}=\text{CH}-$ y $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.

15 5. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HEPARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE -
CONTIENE HEPARINA, según la Reivindicación 1, caracterizado
porque la sal de amonio cuaternaria es una mezcla de sales -
de amonio cuaternarias representadas por las fórmulas:



20 donde R es esencialmente una cadena hidrocarbonada de 8 átomos de carbono como mínimo y X es un anión que comunica a la sal amónica una solubilidad del 2 % como mínimo en agua.

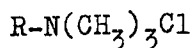
25 6. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HEPARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE -
CONTIENE HEPARINA según la Reivindicación 1, caracterizado -
porque el átomo de nitrógeno de dicha sal de amonio cuaternaria es un heteroátomo de un sistema cíclico heterocíclico.

30 7. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HEPARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE -

1 CONTIENE HEPARINA, según la Reivindicación 1, caracterizado porque el complejo de heparina insoluble en agua es aislado por filtración.

5 8. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HEPARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE CONTIENE HEPARINA según la Reivindicación 1, caracterizado porque el complejo de heparina insoluble en agua es aislado por flotación.

10 9. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HEPARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE CONTIENE HEPARINA, según la Reivindicación 1, caracterizado porque dicha sal de amonio cuaternaria es un compuesto de fórmula:



15 donde R representa un radical hidrocarbonado alifático de 8 átomos de carbono como mínimo.

20 10. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de introducción que se solicita: PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE UN COMPLEJO DE HEPARINA INSOLUBLE EN AGUA, DE UN EXTRACTO ACUOSO ANIMAL QUE CONTIENE HEPARINA.

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

25

Madrid, 16 de Octubre de 1.975

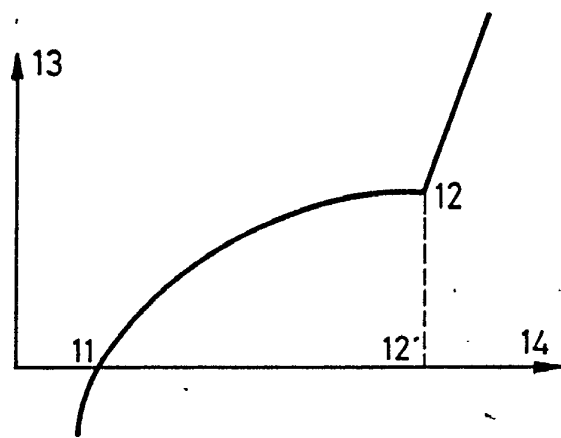
BERNARDO UNGRIA

p.p.



30





ESCALA VARIABLE

Madrid, 16 de Octubre de 1975

BERNARDO UNGRIA

P. P.