

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
CENTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10	ES	11	456196	10	A 1
21		22	FECHA DE PRESENTACION		
			23-2-77		

PATENTE DE INVENCION

P.- 65.099  
DEIN

F.C. 12.4.78

30	PRIORIDADES:	31	NUMERO	32	FECHA	33	PAIS
----	--------------	----	--------	----	-------	----	------

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C08B		

64	TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO PARA LA PREPARACION DE HEPARINA DE ELEVADA ACTIVIDAD ESPECIFICA".	

71	SOLICITANTE (S)
AKTIEBOLAGET KABI	

72	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Lindhagensgatan 133, S-104 25 Estocolmo, Suecia.	

73	INVENTOR (ES)
Lars-Olov Andersson y Erik Yngve Holmer.	

74	TITULAR (ES)

75	REPRESENTANTE
DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ	

LFG.

El invento se refiere a un método para la purificación de heparina, caracterizado porque la heparina resultante es muy pura y posee una actividad específica elevada.

5           La heparina se ha empleado en tratamiento médico durante varias décadas. Es uno de los anticuagulantes mejor conocido y de empleo amplio, entre otras aplicaciones, para la prevención de la trombosis. La heparina es un polisacárido sulfatado que puede prepararse a partir de la  
10 mucosa intestinal o los pulmones de los animales por métodos relativamente complicados. Las preparaciones de heparina empleadas clínicamente hoy en día contienen material con una gran variedad de tamaño molecular, desde aproximadamente 5000 hasta aproximadamente 35.000. La actividad  
15 específica es por lo general aproximadamente 130 unidades por mg. Por tanto, las preparaciones comerciales disponibles hoy en día son bastante heterogéneas. La frecuencia de efectos secundarios en la terapia de heparina es bastante baja pero cuando ocurren casos, presentan a menudo  
20 graves problemas. Algunos de estos efectos secundarios son probablemente originados por las impurezas en la preparación de la heparina.

          Por lo tanto hay buenos argumentos para producir preparaciones de heparina específicamente más activas  
25 y más puras que las de uso corriente. Junto con los estudios de antitrombina, un cofactor de la heparina, se investigaron las posibilidades de fijar la proteína a una matriz. Sorprendentemente, se encontró que la antitrombina fijada a una matriz podía unir específicamente la fracción molecular  
30 de la heparina terapéuticamente empleada que actúa

como vehículo del efecto de la heparina, profiláctico de la trombosis clínicamente valioso. Con condiciones de adsorción y desorción adecuadamente seleccionadas, puede prepararse una heparina extraordinariamente pura. Las actividades específicas obtenidas fueron 200-270 unidades/mg frente a aproximadamente 130 unidades/mg del material de partida. La distribución de pesos moleculares en la heparina específicamente purificada estaba mucho más limitada que en el material primitivo. Además de la antibromina, cofactor de la heparina, pueden emplearse con ventaja otras proteínas que fijan la heparina, tal como un inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina con un peso molecular de aproximadamente 150.000, obtenido durante el aislamiento del factor de coagulación IX (factor B). Con la antibromina fijada en una matriz, se obtuvo la mejor calidad de heparina, con actividades específicas de hasta 270 unidades por mg.

Por lo tanto puede producirse heparina con un alto grado de pureza y actividad específica por el procedimiento del invento que es sencillo y aplicable para el empleo industrial para la preparación de heparina con actividad específica mayor que en el caso de las preparaciones existentes. La determinación de la actividad específica de la heparina se ha realizado de acuerdo con Denson y Bonnar (1975, Brit J. Haematol, 30, p. 139).

Los siguientes ejemplos ilustran el invento:

#### Ejemplo 1

Purificación de heparina sobre una heparina fijada en una matriz. Procedimiento de columna.

Se preparó el absorbente en gel como sigue:

#### Activación

Se disolvieron 3 g de BrCN en 30 ml de agua destilada. Se añadieron 50 ml de agarosa sedimentada (Seph<sup>R</sup>arose 4B, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) a la solución de BrCN. La mezcla se enfrió en un baño de hielo mientras se agitaba. Añadiendo NaOH 4M, el pH aumentó hasta 11,2 y se mantuvo constante durante 10 minutos. El gel se lavó luego con agua destilada fría y con NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M.

#### Unión

200 mg de antitrombina purificada de acuerdo con Miller-Andersson y otros (1974, Thromb Res 5 página 439-452) y disueltos en 50 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M y pH 9,0 se añadieron al gel. La suspensión de la proteína y el gel se agitó moderadamente a la temperatura ambiente durante una noche y luego se lavó cuidadosamente con tampones de elevada fuerza iónica con valores de pH altos y bajos alternativamente.

#### Purificación de heparina

El absorbente de gel que contenía antitrombina fijada en una matriz se introdujo como relleno en una columna y se equilibró con tampón tris 0,05 M y NaCl 0,15 M de pH 7,4. Se disolvieron 300 mg de heparina (Vitrum, actividad específica 130 unidades/mg) en 20 ml de tampón tris 0,05 M y NaCl 0,15 M de pH 7,4 y se bombeó por la columna. A continuación, el gel se lavó con el tampón antes mencionado y luego se desabsorbió la heparina adsorbida con un tampón tris 0,05 M y NaCl 1,0 M de pH 7,4. La sal se separó de la heparina eluida por filtración con gel en agua

destilada en una columna rellena con Sephadex<sup>R</sup> G25 (Pharmacia) y después se liofilizó la heparina. La heparina purificada tenía una actividad específica de 270 unidades/mg. Los estudios de la distribución de los pesos moleculares muestran que tiene una distribución de peso molecular considerablemente más limitada que la heparina primitiva.

Se realizó el análisis de hidrato de carbono con el método de Carbazol- $H_2SO_4$ .

#### 10 Ejemplo 2

##### Purificación de la heparina sobre antitrombina fijada en una matriz. Procedimiento discontinuo.

15 Se preparó la matriz de antitrombina de acuerdo con el Ejemplo 1.

##### Purificación de la heparina

Se disolvieron 500 mg de heparina (Vitrum, actividad específica 130 unidades/mg) en 300 ml de un tampón tris 0,05 M y NaCl 0,15 M de pH 7,4. Se equilibraron 300 ml de antitrombina fijada en una matriz sedimentada en el tampón antes mencionado y se secó con succión. El adsorbente se añadió a la solución de heparina que luego se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El gel se secó con succión sobre un filtro de vidrio y se lavó con 10 x 200 ml de un tampón tris 0,05 M y NaCl 0,15 M de pH 7,4. La heparina adsorbida se desadsorbió a continuación del gel por 3 x 200 ml de tampón Tris 0,05 M y NaCl 1,0 M de pH 7,4. La heparina eluida se concentró por liofilización. La sal restante se separó por filtración con gel sobre Sephadex G25 en agua

destilada, y a continuación se liofilizó la heparina. La actividad específica de la heparina purificada era 250 unidades/mg.

5 Ejemplo 3

Purificación de heparina sobre un adsorbente de gel que contiene un inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina fijado en una matriz.

10

Preparación de adsorbente de gel

15

Durante la purificación del factor de coagulación IX (factor B) (L.-O. Andersson y otros, Thromb Res 7 (1975) página 451-459), se obtuvo el inhibidor de la proteína inter- $\alpha$ -tripsina que fija la heparina. Su peso molecular es aproximadamente 150.000. Se disolvieron 250 mg de esta proteína en 200 ml de un tampón de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M de pH 9,0 y se añadieron luego a 50 ml de Sepharose<sup>R</sup> 4B sedimentada activada con BRCN de acuerdo con el procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 1. La suspensión de gel y proteína se agitó moderadamente a la temperatura ambiente durante una noche. A continuación se lavó el gel como el gel de acuerdo con el Ejemplo 1.

20

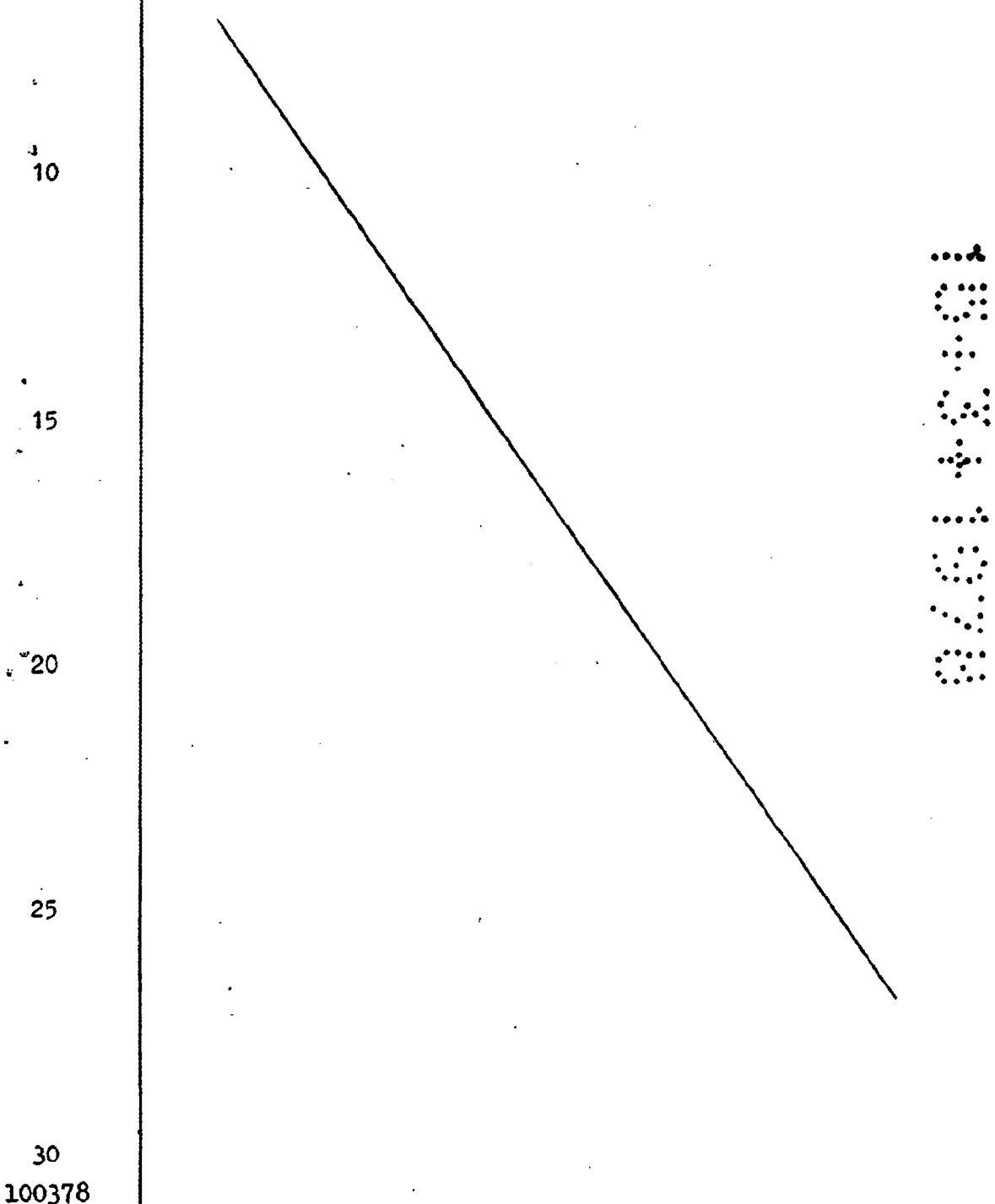
Purificación de heparina

25

El adsorbente de gel que contenía la proteína fijada en una matriz se relleno en una columna. Se disolvieron 300 mg de heparina (Vitrum) en 20 ml de un tampón de tris 0,05 M y NaCl 0,15 M de pH 7,4 y se bombeó por la columna. El gel se lavó con el tampón antes mencionado y la heparina adsorbida se desadsorbió luego con un tampón

30

de tris 0,05 M y NaCl a 0,1 M de pH 7,4. La sal se separó de la heparina por filtración con gel sobre Sephadex G25 en agua destilada y a continuación se liofilizó la heparina. La actividad específica de la heparina purificada era 230 unidades/mg.



REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Un método para la preparación de heparina de elevada actividad específica, caracterizado porque una solución de heparina de una concentración de 0 a 8%, disuelta en un tampón que tiene un valor de pH comprendido entre 5 y 9,5 y una intensidad iónica comprendida entre 0 y 0,8 M, es adsorbida sobre proteínas de plasma que fijan la heparina, fijadas en una matriz, constituidas por anti-trombina III fijada en una matriz o un inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina fijado en una matriz, de una concentración superior a 0,1 mg/ml de gel, y subsiguientemente es eluida utilizando un tampón de un valor de pH comprendido entre 4,5 y 10 y una intensidad iónica superior a 1 M.

2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se utiliza un gel de agarosa sedimentada en calidad de matriz.

3ª.- "UN METODO PARA LA PREPARACION DE HEPARINA DE ELEVADA ACTIVIDAD ESPECIFICA".

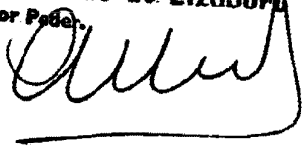
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de NUEVE hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 15. MAR 1978

P.A.

Fernando de Elizaburu  
Por Poderes



...A  
E  
S  
E  
N  
E

1

5

10

15

20

25

30

100378  
VAL