



ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO	10 A1
	476623	
	22 FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
P 20 00 943.0	6 Enero 1978	Alemania
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
		C08B
54 TITULO DE LA INVENCION		
"Procedimiento para la obtención de heparina"		
71 SOLICITANTE (S)		
Schering Aktiengesellschaft		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
1 Berlin 65, Müllerstrasse 170-178 y 4619 Bergkamen, Waldstrasse 14 (Alemania)		
72 INVENTOR (ES)		
Dr. Hans-Jörg Vidic		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
Carlos Fernández Candela		

El invento concierne a un procedimiento para recuperar heparina desde salmuera, que resulta en el caso del tratamiento de intestinos de animales (salmuera de intestinos).

5 Con la heparina, está a disposición de la medicina desde hace largo tiempo un agente anticoagulante que se presenta en la naturaleza, el cual sigue siendo indispensable también en la moderna medicina, y está encontrando una utilización cada vez más amplia.

10 En los últimos años se conocieron toda una serie de procedimientos, todos los cuales tienen como misión aislar la sustancia activa heparina de un modo cada vez más cuidadoso y moderado a partir de tejidos animales que contienen heparina, tales como pulmones, hígados, y en los últimos tiempos sobre todo de mucosa intestinal de animales de ganado vacuno, porcino y ovino (memoria de patente británica 754.885; memoria de patente alemana 1.228.241, memoria de patente de los Estados Unidos 3.058.884, memoria de patente alemana 1.253.868). Tales materias primas, a causa de su fácil putrescibilidad, tienen la desventaja de una limitada capacidad de almacenamiento, que ciertamente puede ser prolongada mediante congelación, lo cual sin embargo, además de a un gasto técnico suplementario, conduce también a considerables aumentos de costos. En el tratamiento se plantean problemas impensables con bastante frecuencia a causa de la molestia por olores ligada con ello causada tanto al perso

15
20
25

nal de servicio como también a los habitantes de la zona colindante.

En la memoria de patente alemana 1.253.868 se describe recopilativamente la obtención de heparina para algunos procedimientos usuales. Según esto se lleva al tejido animal en la etapa inicial a contacto con una solución acuosa caliente de sal, con el fin de extraer la heparina por disolución desde las células. La porción de heparina del medio que resulta en tal caso es extremadamente pequeña.

Se ha encontrado ahora que una salmuera, que resulta en los mataderos y factorías de tratamiento de mucosa intestinal, contiene heparina. Esta salmuera se forma cuando se colocan intestinos de animales, que previamente habían sido liberados de la mucosa intestinal, para su conservación y deshidratación, en soluciones en sal común.

Por lo tanto, en atención a la memoria de patente alemana 1.253.868 hay que designar como manifiestamente sorprendente el hecho de que la salmuera resultante al colocar intestinos de animales en una solución en sal común, contenga grandes cantidades de heparina. Tampoco era de esperar que esta heparina se presentase casi enteramente libre de subproductos químicamente afines, de manera que la salmuera, conocida hasta ahora sólo como producto residual contaminador del ambiente, constituya un nuevo manantial de materias primas para la heparina, ya muy escasa debido a los agotamientos de materias primas. Debido

a la amplia ausencia de impurezas, el tratamiento para formar la heparina bruta puede realizarse de modo especialmente cuidadoso y moderado y, por consiguiente, se suprimen los costosos métodos de aislamiento conocidos según el estado actual de la técnica (véanse memoria de patente de los Estados Unidos 3.451.996 y memoria de patente británica 1.221.784). Finalmente se llega a calidades de heparina, que no pueden lograrse ni con mucho en los preparados de heparina que están disponibles en el mercado. Las heparinas brutas aisladas según procedimientos conocidos de tratamiento a partir de salmuera de intestinos, utilizada según el invento como materia prima, se presentan ya en un grado de pureza tal que la purificación que se realiza seguidamente conduce a heparinas con mucho más de 200 unidades USP/mg. Los preparados de heparina que hasta ahora pueden adquirirse en el comercio poseen por lo general calidades de heparina de 150 unidades USP/mg, y en algunos pocos casos también 155 unidades USP/mg. En tal caso, como una unidad USP/mg se entiende la actividad específica que resulta del ensayo de análisis USP, con el cual se mide la inhibición de la formación de pequeños aglomerados de plasma conservado de cordero. 1 unidad USP corresponde aproximadamente a 1,1 unidades internacionales (UI). Dado que los valores de actividad de los preparados de heparina que se encuentran en el comercio, son además insatisfactorios, a pesar de las numerosas mejoras en los procedimientos, USP prescribe -

por ejemplo que los preparados de heparina (obtenidos de mucosa intestinal) deben contener, por lo menos, 140 unidades USP. Solamente en el laboratorio, llegaron antes - de ahora L. W. Kananagh y L. B. Jaques /Arzneimittelforschung (Drug Res.) 24, Nº 12, 1942 (1974) 7a aislar heparina por repetida cristalización como sal de bario con - como máximo 175 unidades USP/mg.

Para la conservación y deshidratación de intestinos de animales son apropiadas en especial soluciones de sal común, cuyo contenido de sal común es de desde - 0,5 m hasta la cantidad molar de saturación. Se prefieren especialmente las soluciones de sal común, cuyo contenido de sal común es de desde 3 m hasta la cantidad molar de saturación. Como cantidad molar de saturación se entiende la cantidad molar de sal común que contiene disuelta una solución acuosa concentrada, a la temperatura ambiente, procedente de un matadero. (Una solución acuosa concentrada de sal común tiene una concentración de - aproximadamente 26,4%).

Una solución acuosa concentrada de sal común se forme también por ejemplo esparciendo con sal común los intestinos de animales húmedos con goteo.

En general, los intestinos de animales desprovistos de mucosa son tratados durante un tiempo de desde 2 horas hasta 3 días con soluciones de sal común. La mayor parte de las veces, sin embargo, el tratamiento de los - intestinos de animales ya está terminado después de 3-24

horas. Tras eliminar los intestinos de animales conservados y deshidratados desde la solución de sal común se obtiene una salmuera de intestinos, que posee un contenido sorprendentemente elevado de heparina.

5 Mediante la utilización según el invento de tales salmueras de intestinos como materia prima, se llegó a aislar heparina también a escala técnica en un grado de pureza tal que ésta se presenta como sustancia casi incolora. Todas las heparinas brutas disponibles hasta
10 hoy día a partir de otras materias primas deben por el contrario ser decoloradas sólo mediante procedimientos costosos y ligados con grandes pérdidas (memoria de patente de los Estados Unidos 3.179.566).

Además de ello la salmuera de intestinos es una
15 materia prima casi inodora, apta para el almacenamiento, que no experimenta ningún menoscabo de calidad debido a un largo almacenamiento. Por consiguiente, se suprimen métodos de conservación químicos y de otro tipo.

El invento concierne, por consiguiente, a la
20 utilización de una salmuera de intestinos, que ha sido obtenida por colocación de intestinos de animales, liberados de mucosa intestinal, en soluciones de sal común, para la preparación de heparina pura así como a un procedimiento para el aislamiento de heparina pura a partir de
25 soluciones salinas de tejido animal, caracterizada porque como material de partida se utiliza salmuera de intestinos que ha sido obtenida por colocación de intesti-

nos de animales, liberados de mucosa intestinal, en soluciones de sal común.

EJEMPLO 1

5 600 litros de salmuera fueron mezclados agitando con 600 litros de metanol en el espacio de media hora en un aparato agitador de 1500 litros de capacidad, a temperatura ambiente. Se siguió agitando luego durante el mismo tiempo, después de lo cual la mezcla permaneció en reposo durante aproximadamente una hora.

10 Luego se decantó la porción sobrenadante turbia en un segundo recipiente y se dejó como residuo la torta salina precipitada. La suspensión obtenida permaneció en reposo luego durante dos días. Después de ello se siguió decantando, se desechó la porción sobrenadante y se aisló el precipitado por centrifugación. Después del secado en vacío se obtuvieron 1,44 kg de un producto que poseía aproximadamente 10 unidades USP/mg. Este consistía todavía en aproximadamente 45% en sal común. Una porción alícuota de la heparina bruta así obtenida, correspondiente a aproximadamente 425.000 unidades USP, o 42,5 g fue extraída tres veces cada vez con 200 ml de solución de sal común dos molar, agitándose cada vez durante una hora a 60°C. Los extractos reunidos fueron diluidos con agua, hasta que la solución contenía aproximadamente 0,9 moles/litro de iones cloruro. Se añadieron luego 200 ml de un intercambiador de aniones (Lewatit CA 9249) en la forma

15

20

25

de cloruro y se agitó durante una hora. A continuación -
se filtró con succión y se lavó posteriormente con apro-
ximadamente 200 ml de solución 0,9 molar de sal común. El
intercambiador de iones fue agitado luego durante cinco
5 horas con solución de sal común dos molar a 40°C y des-
pués de ello se filtró con succión y se lavó posterior-
mente con solución de sal común dos molar. La solución -
de elución fue reunida con la solución de lavado y preci-
pitada con un volumen 1,5 veces mayor de metanol. El pre-
10 cipitado fue separado por centrifugación, fue lavado pri-
mero con aproximadamente 50 ml de agua-metanol (1 + 1,5
partes en volumen) y luego con aproximadamente 50 ml de
metanol y después fue secado.

Se obtuvieron 198 g de heparinato sódico con 195
15 unidades USP por mg.

15,5 g de un heparinato sódico obtenido del modo
precedentemente descrito; con aproximadamente 200 unida-
des USP por mg, fueron disueltos en 200 ml de solución -
dos molar de sal común. La solución fue filtrada a través
20 de un embudo Buchner y el residuo fue lavado primero con
30 ml de solución dos molar de sal común y luego con -
aproximadamente 250 ml de agua totalmente desalinizada.
Las soluciones reunidas fueron llevadas a una molaridad
de cloruro de 0,9 con agua totalmente desalinizada. Des-
25 pués se repitió como anteriormente la purificación con -
un litro de Lewatit CA 9249.

Las soluciones de elución y de lavado reunidas

fueron tratadas adicionalmente tal como arriba se indica. Después del lavado y del secado del precipitado se obtuvieron 11,2 g de heparinato sódico, que poseían una actividad de 251 unidades USP por mg.

5 EJEMPLO 2

Similarmente a la memoria de patente británica 754.885, 3 litros de salmuera fueron acidificados a pH 3,1 - 3,2 con ácido acético (aproximadamente 50 ml) con agitación. Después de algunas horas se decantó y el resto se centrifugó. El precipitado fue desechado y las soluciones reunidas fueron neutralizadas con lejía de sosa.

Luego, con agitación, se mezcló lentamente con el mismo volumen de metanol. Tras 45 minutos se separó por decantación de la sal común precipitada. Esta suspensión se dejó reposar durante varias horas, la porción sobrenadante se decantó y el resto se centrifugó. El precipitado fue secado en vacío. Se obtuvieron 3,43 g con 21 unidades USP/mg. Una porción alícuota de la heparina bruta así obtenida, correspondiente a aproximadamente 425.000 unidades USP, o a 20,2 g, se purificó de manera análoga al Ejemplo 1. Se obtuvieron 10,65 g de heparinato sódico con una actividad de 262 unidades USP por mg.

20 EJEMPLO 3

25 3 litros de salmuera fueron diluidos con 12 litros de agua a una molaridad de cloruro de aproximadamen

te 0,85 m. Luego se añadieron 50 g de tierra de infusorios así como una solución de 6 g de cloruro de bezetonio (= Hyamin 1622, Rohm & Haas) en 100 ml de agua. Tras algunas horas se decantó y el resto se filtró con succión. Después del lavado con agua, el precipitado todavía húmedo fue extraído tres veces, según el procedimiento de la memoria de patente alemana 1.228.241, cada vez con 200 ml de solución 2 molar de sal común. Los extractos reunidos fueron precipitados con 2 partes en volumen de metanol. El precipitado aislado y secado pesaba 465 mg y poseía una actividad de 155 unidades USP/mg.

EJEMPLO 4

30 litros de salmuera fueron diluidos con 120 litros de agua a una molaridad de cloruro de aproximadamente 0,85 m (véase memoria de patente alemana 1.156.938). Luego se acidificó a pH 3,2 con ácido acético (aproximadamente 50 ml). Después de algunas horas se había depositado un precipitado, el cual fue separado por centrifugación tras la decantación de la porción sobrenadante transparente. Después del secado se obtuvieron 111 g de heparina bruta con 6,5 unidades USP/mg. Una porción alicuota de la heparina así obtenida correspondiente a aproximadamente 425,000 unidades USP, o 65,5 g, fue purificada primero de modo análogo al Ejemplo 1. Después de la primera etapa de purificación sobre intercambiadores de iones se obtuvieron 196 g de heparinato sódico con 198 unidades

USP por mg.

15 g de un heparinato sódico con aproximadamente 200 unidades USP por mg, obtenido del modo precedentemente descrito, fueron disueltos en 200 ml de solución de cloruro de calcio dos normal. La solución fue filtrada sobre un embudo Buchner y el residuo fue lavado primero con 30 ml de solución de cloruro de calcio dos normal y luego con aproximadamente 250 ml de agua totalmente desalinizada. Las soluciones reunidas fueron llevadas luego a una molaridad de cloruro de 0,9 con agua totalmente desalinizada. Después se agitó, como anteriormente, con 1 litro de Lewatit CA 9249. La elución y el lavado posterior se llevaron a cabo con solución dos normal de cloruro de calcio en lugar de con solución de sal común.

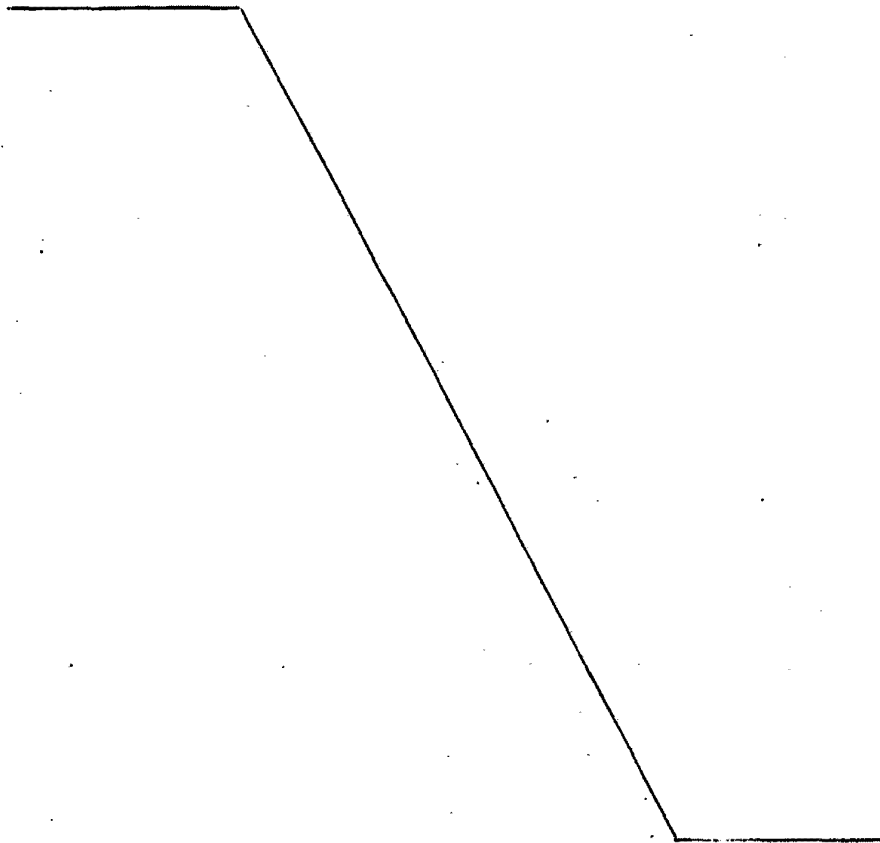
15 Las soluciones de elución y de lavado reunidas fueron tratadas adicionalmente tal como arriba se describe. Después del lavado y del secado del precipitado se obtuvieron 10,7 g de heparinato cálcico, que poseían una actividad de 260 unidades USP por mg.

20 EJEMPLO 5

10 litros de salmuera fueron diluidos con 40 litros de agua a una molaridad de cloruro de aproximadamente 0,85 m. Esta solución fue bombeada a través de un filtro sobre una columna intercambiadora de iones con un diámetro de 26 mm y una longitud de 380 mm (caudal aproximadamente 3 litros por hora). Se utilizó una resina in

tercambiadora de aniones macroporosa de basicidad media, en la forma de Cl^- (Lewatit CA 9249). También se pueden utilizar otras resinas intercambiadoras de aniones, tales como por ejemplo la Dowex 1-X-1 descrita en la memoria de patente alemana 1.253.868.

A continuación se retiró la resina desde la columna, se lavó dos veces con 500 ml de solución de sal común 0,9 molar y se eluyó con agitación a 40°C durante 5 horas con 400 ml de solución de sal común 2 molar. Esta solución fue precipitada con 1,5 partes en volumen de metanol. El precipitado aislado y secado pesaba 1,2 g y poseía 149 unidades USP/mg.



- REIVINDICACIONES -

5 1.- Procedimiento para la obtención de heparina, caracterizado porque la salmuera obtenida por tratamiento de intestinos, tripas, de animales sacrificados con soluciones concentradas de sal común a temperaturas entre 0 y 30 grados celsius es diluida con agua en la proporción de salmuera: agua de 1:3 hasta 1:10, y a continuación se separa heparina a partir de la solución diluida que contiene heparina.

10 2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque a partir de la solución diluida que contiene heparina, se precipita heparina con una sal de amonio cuaternario.

15 3.- Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque a partir de la solución diluida que contiene heparina se precipita heparina por acidificación a un valor de pH de aproximadamente 3.

20 4.- Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque a partir de la solución diluida que contiene heparina se separa heparina por intercambio de iones con una resina intercambiadora de aniones.

25 5.- Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque a partir de la solución diluida que contiene heparina se precipita heparina con cloruro de bencetonio.

6.- Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque a partir de la solución diluída que contiene heparina se precipita heparina por acidificación con ácido acético a un valor de -
5 pH de aproximadamente 3.

7.- Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque a partir de la solución diluída que contiene heparina se separa heparina por in-
10 tercambio de iones con una resina intercambiadora de aniones macroporosa de basicidad media en la forma C1.

8.- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE HEPARINA".

Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 5 ENE. 1979

