



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1197/80

(51) Int.Cl.5

C 08 B 37/10

(22) Indleveringsdag: 20 mar 1980

(41) Alm. tilgængelig: 22 sep 1980

(44) Fremlagt: 01 jun 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 21 mar 1979 HU RI-705

(71) Ansøger: *RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT; 19, Gyoemroei ut; Budapest X, HU

(72) Opfinder: Istvan *Takacs; HU, Gyoergy *Kevey; HU, Janos *Illes; HU, Peter *Rudolf; HU, Pal *Gere; HU, Laszlo *Czebe; HU, Erzsebet *Neszmelyi; HU

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et heparinholdigt råmateriale ud fra heparinholdige animalske organer

(56) Fremdragne publikationer

GB pat. nr. 1505237

1197-80

(57) Sammendrag:

Det heparinholdige råprodukt fremstilles ud fra indsamlede og bearbejdede animalske organer. Disse forbehandles, efter eventuel opskæring, i vandigt medium ved 10-50°C i 0,5-15 timer. Derpå udskilles det i vand uopløselige heparin-proteinholdige kompleks fra den forbehandlede, vandige suspension ved en temperatur fra 75 til 100°C, hvorpå komplekset isoleres. Dette heparinholdige mellemprodukt tørres ved en temperatur fortrinsvis under 100°C indtil dannelsen af et sprødt produkt med 90-95% tørstofindhold.

Ved fremgangsmåden opnås optimal udnyttelse af det heparinholdige råmateriale stammende fra slagterier under samtidig borttagelse af de i de animalske organer tilstedeværende inaktive bestanddele.

1197-80

Det således fremstillede råprodukt har ensartet sammensætning, lavt fedtstofindhold og lavt kimal, det kan oplagres uden ændring af morfologi og indhold af aktivbestanddele, og det er egnet til oparbejdning til heparin af lægemiddelkvalitet fortrinsvis ved modstrømsextraktion.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af en ny type af heparinholdigt råmateriale ud fra heparinholdige animalske organer, hvorved den industrielle fremstilling af heparin forbedres betydeligt.

5

Heparin er på grund af dets antikoagulerende egenskab et vigtigt lægemiddel. Dets syntetiske fremstilling er ikke løst, og således er råmaterialet for heparinfremstilling i stor målestok uvægerligt animalske organer, som er rige på heparin, såsom tyndtarmen fra svin, kvæg eller får og lunger, idet den aktive ingrediens, heparin, selv i de animalske organer, som er rige på heparin, kun udgør fra 10^{-2} til 10^{-3} % af deres vægt, hvilket er et yderst lavt indhold. Adskillelse af den lille mængde aktiv ingrediens fra den store masse af ballastmateriale i råmaterialet er i sig selv problematisk, men vil især være det, hvis de ledsagende materialer ændrer deres egenskaber, såsom ved nedbrydning under opbevaring eller transport af råmaterialet.

20

For at gennemføre økonomisk industriel produktion er det derfor, ud over det åbenbare krav om at bevare organets totale heparinindhold indtil forarbejdningen, også nødvendigt, at de fysiske, kemiske og morfologiske egenskaber af de inaktive materialer, at det udgør hovedparten af organet, forbliver uændrede. Enhver ændring i de inaktive materials egenskaber kan forårsage sådanne forarbejdnings- og rensningsproblemer under forløbet af den farmaceutiske forarbejdning (ekstraktion osv.) af de heparinholdige råmaterialer, som kan gøre den økonomiske fremstilling af et egnet slutprodukt umulig.

30

Det er tilrådeligt at opfylde disse krav allerede under præpareringen (indsamling og opbevaring) af råmaterialet.

35

Vigtigheden af indsamling og opbevaring af de heparinholdige råmaterialer behandles kun i nogle få patentskrif-

ter, f.eks. HU patentskrift nr. 148 776 og 149 329 og US patentskrift nr. 2 587 924, men selv disse beskæftiger sig kun perifert med dette spørgsmål. Vigtigheden af en egnet behandling af råmaterialerne under indsamlingen og opbevaringen af organerne kan indses ved betragtning af de følgende alment kendte fakta:

Levende organer, som er i fysiologisk balance, indeholder heparinet i forskellige former, hovedsageligt knyttet til forskellige proteiner. Når dyrene slagtes, forstyrres den fysiologiske balance af de levende organer og væv, og autolysen på grund af de hydrolyserende, først og fremmest proteolytiske, enzymer i de overlevende væv begynder øjeblikkeligt, hvorved der sker en ukontrolleret nedbrydning af de ledsagende ballastmaterialer, af og til koblet med nedbrydning af den aktive ingrediens. På den anden side sker ved indsamlingen og opbevaringen af de animalske organer, der sædvanligvis finder sted under ikke-sterile omstændigheder, en mikrobiologisk forurening, hvorved der frigøres enzymer, som nedbryder protein og aktiv ingrediens. Virkningen deraf er identisk med den førstnævnte virkning af vævenes egne enzymer. US patentskrift nr. 2 884 358 henviser i spalte 1, linie 51-53 til den ubehagelige lugt, som opstår under opbevaring af de animalske organer, den misfarvning, som påvirker selv slutproduktet, opståen af pyrogenicitet og reduktion af den ekstraherede mængde heparin.

Tre fremgangsmåder til indsamling og opbevaring af heparinholdige organer har vundet almen anerkendelse:

- 1) Hurtig frysning og dybfrossen opbevaring af organerne i naturlig tilstand;
- 2) hurtig frysning og dybfrossen opbevaring af organerne efter varmedenaturering (hvor der i almindelighed før denatureringen foretages hakning og tilførsel af vand); og

3) konservering af det med vand fortyndede hakkede produkt af organerne (i tilfælde af slimhinder: uden hakning, men efter delvis afvanding af den fortyndede vandige suspension, som fås ved tarmrensningen) med kemikalier, almindeligvis med forskellige uorganiske salte.

Fremgangsmåderne (1) og (2) har den ulempe, at de er energi-, investerings- og arbejdskrævende. Hurtig opnåelse af temperaturen -18°C og opretholdelse af denne under opbevaringen og derpå under leverancen indtil påbegyndelse af forarbejdning stiller høje energi- og investeringskrav (der må udvikles en sikkert fungerende kølekæde). Arbejdsintensiteten fremgår af den høje arbejdskraftkapacitet, som er bundet i håndteringen af organerne med højt (77-85 %) vandindhold, emballering, levering og forberedelse af produktionen (pakning i frossen tilstand). Den tredie fremgangsmåde, dvs. konserveringen med kemikalier, er utvivlsomt mindre energikrævende end de førstnævnte, men på grund af det opsamlede materiales høje vandindhold (86-90 %) øges leveringsrumfanget og omkostningerne betydeligt. Korrosionen af de specielle transport- og opbevaringsindretninger, der kun anvendes til dette formål, er mere intensiv på grund af de anvendte kemikalier, og frostbeskyttelse af opbevaring- og transportindretningerne ved en temperatur, som permanent er under frysepunktet, er vanskelig og dyr. For at reducere leverings- og opbevaringsomkostningerne opsamles kun en del af organerne i fortyndede vandige opløsninger (f.eks. vandig slimhindeopslæmning ved tarmrensning), dvs. kun den del, som har relativt højt indhold af aktiv ingrediens. På denne måde formindskes imidlertid den mængde organ, som kan opsamles fra hvert dyr, og mængden af heparin formindskes, hvorfor opsamling af den samme mængde heparinindhold kræver udstyr i flere slagterier.

Ulempen ved alle de tre opsamlingsmetoder er, at der kun kan etableres næsten bakteriostatisk betingelser under

opsamlingen og opbevaringen, hvilket kun delvis eller slet ikke udelukker enzymindvirkningen. Enhver teknologisk fejl (f.eks. periodisk afbrydelse af kølekæden, højere bakterietal fra starten, forurening osv.) kan føre
5 til ophør af de næsten bakteriostatiske betingelser og dermed til forøget og ukontrollabel enzymvirkning, hvilket fører til mere intensiv reduktion af aktiv ingrediens og ændring af organsammensætningen og således til oparbejdningsproblemer.

10

Problemerne på grund af ændring af sammensætningen (nedbrydning) forværres af organernes høje naturlige fedtindhold.

15

Ulemperne ved de anvendte indsamlingsmetoder ville kunne elimineres ved den metode, som bedst kan virkeliggøres i praksis, hvorved det friske organ på oprindelsesstedet kontinuerligt forarbejdes til heparin eller til et mellemprodukt, som er let at opbevare. På lignende måde vil
20 le en tilfredsstillende løsning kunne være den øjeblikkelige tørring af de friske organer (afvanding med opløsningsmiddel, ved frysetørring eller pulverisering) og oparbejdning af det således opnåede mere stabile pulverformede organ efter opbevaring. Imidlertid syntes anvendelsen af disse fremgangsmåder kun at være gennemførlig under laboratoriebetingelser af økonomiske grunde (høje omkostninger til opløsningsmiddel eller høje investerings- og procesomkostninger). (Methods of Biochemical Anal.: Vol. 24, side 244, 1977; Methods of Biochemical Anal.:
25 Vol. 7, side 269; Methods of Carbon Chem.: Vol. 7, side 90, 1976).

30

35

På basis af det ovenstående kan det fastslås, at den første fase af heparinfremstillingen i industriel målestok - indsamling af heparinholdige organer, nødvendig opbevaring før oparbejdningen - ikke løses optimalt, fordi sammensætningen og dermed indholdet af aktiv ingrediens va-

rierer inden for vide grænser. Derfor har de patenter, som beskæftiger sig med fremstillingen af heparin i industriel målestok, forsøgt at indføre sådanne teknologiske trin i fremgangsmåderne til ekstraktion af den aktive ingrediens, som tilvejebringer mulighed for effektiv oparbejdning af de mest typiske organer af gennemsnitskvalitet, som er til rådighed. Af det forudgående følger, at produktionsteknologierne ikke kan realiseres i det optimale niveau på grund af den svingende kvalitet af organ-
10 materialet.

I GB patentskrift nr. 1 505 237 er beskrevet en fremgangsmåde til fremstilling af et affedt heparinholdigt råmateriale, som går ud fra dybfrosset heparinholdigt dyrevæv. Ved denne fremgangsmåde bliver det frosne væv efter findeling optøet, opvarmet til 7-35 °C og autolyseret i 2-15 timer, hvorefter blandingen underkastes azeotrop ekstraktion med et organisk opløsningsmiddel til afvanding og affedtning af vævet. Derved forbedres heparinets tilgængelighed, men af de inaktive materialer fjernes kun fedtet. Desuden er strukturen af det opnåede råmateriale uændret, dvs. cellemembraner og andre membraner og fibre forbliver i deres oprindelige tilstand.

Opfindelsen er rettet mod fremstilling af en ny type råmateriale for heparinfremstilling i industriel målestok og i et kontinuert system, som muliggør optimal udnyttelse af det tilgængelige heparinholdige materiale under samtidig fjernelse af de inaktive materialer, som er til stede i de animalske organer (fedt, uorganiske salte, polypeptider, nucleotider, nucleosider osv.), således at der sikres en hidtil ukendt høj koncentration af den aktive ingrediens. Desuden er den kemiske, fysiske og morfologiske sammensætning af det opnåede materiale konstant. Opbevaret ved stuetemperatur beholder det sin sammensætning i et ubegrænset tidsrum uden behov for specielle betingelser, herunder kimtallet, som er meget lav

under de anvendte betingelser. Ud fra den nye type råmateriale kan der fremstilles et slutprodukt af terapeutisk kvalitet ved enhver kendt industriel heparinekstraktionsmetode på en sådan måde, at oparbejdningsteknologierne på grund af den uændrede sammensætning, det høje heparinindhold og den lille mængde ledsagende materiale og lave fedtindhold kan optimaliseres i højere grad end tidligere. På grund af den fysiske form af det nye råmateriale, som er inden for et afgrænset kornstørrelsesområde med stor overflade, og som er amorf og bevares selv i vådt medium, kan der opnås yderligere fordele i den såkaldte ekstraktionsfase af den industrielle heparinfremstilling (mulighed for modstrømsekstraktion).

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen angår fremstilling af et heparinholdigt råmateriale ud fra heparinholdige animalske organer, hvilket råmateriale har en konstant sammensætning med højt indhold af heparin og lavt fedtindhold og kimtal og uden ændring i morfologien og heparinindholdet, og det særegne ved fremgangsmåden er, at de heparinholdige animalske organer, om nødvendigt efter hakning suspenderes i vandigt medium og lagres i det vandige medium ved 10-50 °C i 0,5-15 timer, hvorefter et i vand uopløseligt heparin-protein-holdigt kompleks udfældes fra den autolyserede suspension ved opvarmning til 75-100 °C og omdannes til let filtrerbare aggregater ved fortsat varmebehandling, bundfaldet skilles fra, og det isolerede heparinholdige råmateriale tørres, fortrinsvis ved en temperatur under 100 °C, indtil der er opnået et smuldrende holdbart produkt med 90-95 % tørstof.

Udgangs-råmaterialet er fortrinsvis svinetyndtarm, slimhinder, serøse hinder og okselunge, men ethvert andet heparinholdigt organ, såsom oksetyndtarm, fåretyndtarm, oksemilt, andre indvolde, lever osv., kan anvendes til dette formål. Når der anvendes slimhinder, er hakning og vandfortynding ikke nødvendig. De andre dyreorganer hak-

kes til 4-6 mm størrelse, og der fremstilles en vandig suspension, som i varierende grad har heparin og proteiner i opløsning og også i form af kolloidal opløsning. Den vandige suspension indstilles til et tørstofindhold på 1,5-17 %. Fortyndingen udføres med vand, fortrinsvis med en temperatur på 36-42 °C, således at ydre opvarmning ved autolysen ikke er nødvendig eller kun er nødvendig i mindre grad. Den opnåede suspension ud fra de sædvanlige heparinholdige materialer holdes i temperaturområdet 30-50 °C, almindeligvis i 2-6 timer. Efter autolysen foretages udfældning af heparin-protein-komplekset ved direkte indblæsning af damp i suspensionen eller ved varmebehandling af suspensionen i et længere tidsrum, medens hovedparten af det tilstedeværende heparin fikseres til de filtrerbare proteiner. Varmebehandlingen udføres i et kontinueret system ved 85 °C eller derover i mindst 2 minutter eller i et intermitterende system i 15 minutter eller længere. Ved udfældning af proteinerne opnås gunstig kornstørrelse m.h.t. isoleringen ved filtrering, og samtidig ødelægges også de virulente kim. Bundfaldet isoleres med ca. 20-25 % tørstofindhold i en optimal mekanisk separator, som fungerer ved tyngdekraftens virkning. Den mekaniske separator bør have en eventuelt kontinueret regenererende filteroverflade, men kontinueret eller intermitterende plansigter, kurvesigter, centrifuger eller skrueseparatorer er også anvendelige. Det udtømte filtrat, som kan indeholde 5-35 % af det oprindelig tørstofindhold og, afhængigt af den kontrollerede forbehandling, er sammensat af ikke-varmedenaturerbare proteiner, peptider, nucleinsyrederivater, fedtstoffer, lipoider og mineralsalte, ledes til kloaken. Det isolerede heparinkoncentrat tørres i en tørreovn ved 100 °C til 90-95 % tørstofindhold, hvorved der opnås et fedtfattigt koncentrat i form af amorfe partikler med stor overflade og med en kornstørrelse hovedsageligt mellem 0,2 og 1,6 mm, som er opbevaringsstabil i lang tid og er særlig egnet til f.eks. intermitterende eller kontinueret modstrømsekstrak-

tion.

Det blev erkendt og påvist eksperimentelt i eksempel 1, at der blandt proteinkomponenterne i de friske heparinholdige organer kan findes et stort overskud af sådanne proteiner i forhold til det naturlige heparinindhold, som er i stand til at fikserer det opløste heparin og heparinprotein-komplekser på en sådan måde, at de kan isoleres fra opløsningen efter den konventionelle irreversible varmedenaturering. Mængden af disse proteiner, som er egnede til at fikserer heparinet, falder som funktion af autolysehastigheden og -tiden (dekomponering), eftersom de overskydende proteiner, der er i stand til at fikserer heparin, nedbrydes til polypeptidfraktioner, som ikke denatureres af varme og således er uegnede til fiksering.

Endvidere blev det erkendt og påvist i eksempel 2, at der ved anvendelsen af den kontrollerede kortvarige autolyse i de friske organer kan opnås en reduktion i mængden af både de overskydende heparinfikserende proteiner og andre proteiner ved nedbrydning af disse til delenheder, som ikke denatureres af varmepåvirkningen, således at der på denne måde efter denaturering med efterfølgende varmebehandling kan opnås et råmateriale, som er rigere på heparin end de naturlige udgangsmaterialer. De gennemførte forsøg førte til de overraskende og uventede resultater, at nedbrydningshastigheden af de proteiner, som er egnet til fiksering af heparinet, er væsentligt lavere end af de proteiner, som er ude af stand til fiksering, og endvidere at det under autolyseprocessen også er muligt at opnå fjernelse af nucleotiderne, nucleosiderne osv., dvs. andre ledsagende produktionsforstyrrende komponenter, i filtratet. Som resultat af disse samlede erkendelser har det fremstillede råmateriale et tørstofindhold på 20-25 %, det er et beriget råmateriale praktisk taget uden tab af heparin, som i sammenligning med de naturlige råmaterialer, hvorfra heparinet opløses ved enhver af de sæd-

vanlige ekstraktionsmetoder, beregnet på tørstof indeholder 5-35 % mindre ledsagende materiale, som forstyrrer heparinekstraktionen.

- 5 Erkendelsen inkluderer, at det fremstillede råmateriales varmefølsomhed er lavere end heparinets. Derfor kan de dyre og komplicerede tørringsmetoder, såsom lyofilisering, pulvertørring eller afvanding med opløsningsmiddel, elimineres, fordi den heparin-protein-binding, som er udviklet inden i organet, har en beskyttende virkning på
- 10 heparinindholdet, som gør det muligt at holde organet ved en temperatur over 100 °C selv i flere timer.

Fordelene ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan opsummeres som følger:

15

- 1) Der kan fremstilles en ny type heparin-råmaterialekoncentrat med 90-95 vægt-% tørstofindhold, som kan opbevares uden ændring af heparinindholdet og sammensætningen
- 20 ved normal temperatur i lang tid;

- 2) det nye råmateriale gør det muligt ved ekstraktion af heparinindholdet at opnå optimalt udbytte beregnet på dyreorganenhed;
- 25

- 3) de nødvendige fremgangsmådetrin kan let udføres i de dyreorgan-forarbejdende anlæg, hvilket repræsenterer lave specifikke plads-, energi- og investeringskrav;

- 4) kimtallet i det heparinholdige råmaterialekoncentrat er lavt, da det kun indeholder en lille mængde lipoider og fedt;
- 30

- 5) det nye råmateriales konsistens og kornstørrelse er meget favorabel med henblik på teknologien ved yderligere forarbejdning, og heparinet, som er isoleret over for varmepåvirkning fikseret til de native proteiner, mobi-
- 35

liseres let, dvs. det kan opløses igen;

6) den konstante sammensætning af det heparinholdige råmaterialekoncentrat giver fordelagtig mulighed for simplificering og optimalisering af den fuldstændige forarbejdningsteknologi;

7) selv lang-distance-transport af råmaterialet er økonomisk;

10

8) behovet for arbejdskraft er lavt ved kontinuert udøvelse af fremgangsmåden.

15

20

25

30

35

Ifølge en foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelsen hakkes det heparinholdige animalske organ, om nødvendigt, i en industriel kødhakker til en kornstørrelse på 4-6 mm i overensstemmelse med slagtning- og opskæringshastigheden. Det animalske organ fortyndes med vand med en temperatur på 18-50 °C til en koncentration på 1,5-17 %. Den vandige organsuspension leveres af en pumpe ind i det udstyr, der anvendes til den indledende autolyse, og holdes ved 30-50 °C i 2-6 timer. Efter forbehandlingen underkastes organsuspensionen varmebehandling ved 82-100 °C. Til varmebehandlingen anvendes en direkte dampinjektor. Derpå udfældes et heparinholdigt bundfald i form af let filtrerbare smuldrende korn fra den vandige organsuspension i et kontinuert system af isoleret rørsektion ved en langsom strømningshastighed i 2-6 minutter. Det vandige medium, som kun indeholder inaktive forstyrrende materialer, fjernes fra det smuldrende bundfald under tyngdekraftens virkning, f.eks. igennem sigter, og råmaterialet opnås med et tørstofindhold på mindst 23 %. Filtrering kan udføres i filterenheden af det udstyr, der er beskrevet i HU patentansøgning nr. RI-705, der sikrer en konstant regenererende effektiv filteroverflade, således at fedtekstraktionen osv. bliver mere effektiv end i de intermitterende systemer,

og effektiviteten kan forøges yderligere af det indbyggede vaskningssystem. Det isolerede råmateriale kan opbevares uden afkøling og frysning, hvis det våde råmateriale kontinuert tørres ved den hastighed, hvormed det
5 dannes, i den meget effektive tørringsenhed af det udstyr som er beskrevet i den nævnte HU patentansøgning. Under tørringen reguleres temperaturen af både dampen og luften såvel som af den fugtige luft, der forlader udstyret, på en sådan måde, at der opnås et heparinholdigt råmaterialekoncentrat med en kornstørrelse på 0,2-1,6 mm og med
10 ca. 92 % tørstofindhold i løbet af en relativt kort tørringsperiode mellem temperaturgrænserne 80-180 °C ved indgangen og 50-110 °C ved udgangen. Dette koncentrat er enzymfattigt, har konstant sammensætning, har lavt kimtal, er fedtfattigt og bevarer sin sammensætning uændret
15 i det industrielt beregnede temperaturområde i lang tid. Dets lave kimtal muliggør ikke kimformering, så det er økonomisk at opbevare og transportere. Heparinindholdet af det opnåede råmaterialekoncentrat varierer afhængigt af heparinindholdet i det oprindelige animalske organ.
20 Hvis man går ud fra svineslimhinde, opnås et produkt med 0,15 kg/10⁵ IE aktiv ingrediens, som indeholder væsentligt mindre ballastmateriale end de andre heparinråmaterialer. Heparinet kan bringes i vandig opløsning fra det opnåede råmaterialekoncentrat ved enhver af de konventionelle ekstraktionsmetoder under mere favorable betingelser end med de hidtil anvendte råmaterialer. Den beskrevne fremgangsmåde kan udføres i et intermitterende system under bevarelse af de fundamentale fordele.

30 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved de efterfølgende udførelseseksempler, hvor eksempel 1 og 3 belyser nogle af de erkendelser, opfindelsen bygger på; mens eksempel 2 viser en sammenligning af to råprodukter
35 fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen med henholdsvis det rå udgangsmateriale og et råprodukt, som er behandlet ved denaturering uden forudgående autolyse,

og eksempel 4 viser en foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelsen og en sammenligning af produktet med produkterne opnået i eksempel 3.

5 EKSEMPEL 1

Dette eksempel viser, at koncentrationen af de heparinfikserende proteiner i de friske animalske organer er højere end koncentrationen af heparin.

10

1,0 kg frisk slimhinde fra svinetyndtarm med 16,0 vægt-% tørstofindhold fortyndes med 1,0 liter vand. Pulveriseret rent heparin blev opløst i fortyndingsvandet til en heparinkoncentration på 82 IE/ml. Suspensionen blev opvarmet til 85 °C under blanding og derefter blev det varme denaturerede organ skilt fra i en sigte efter en hvileperiode i 5 minutter. På basis af en prøve taget fra de 1380 ml filtrat blev det fastslået, at heparinkoncentrationen var 1,4 IE/ml, dvs. at ca. 80 000 IE af de tilsatte 82 000 IE heparin var fikseret til det denaturerede animalske organ.

15

20

25

30

Hvis slimhinden fra den friske svinetyndtarm holdes ved stuetemperatur i 36 timer og så fortyndes med 1,0 liter vand pr. kg, tilsat heparin til en koncentration på 41 IE/ml, og der endelig udføres varmedenaturering ved 85 °C, så findes det, at heparinkoncentrationen i de 1440 ml filtrat er 2,1 IE/ml, dvs. at den heparinfikserende evne hos det denaturerede organ opnået ved forarbejdning af 1,0 kg slimhinde, er reduceret til 38 000 IE heparin.

35

EKSEMPEL 2

Dette eksempel påviser, at der ved fjernelse af ballastmaterialerne i organerne kan fremstilles et råmateriale med en hidtil ukendt koncentration af heparin uden tab af heparin, fordi nedbrydningshastigheden af de organdele, som er indifferente med hensyn til heparin-protein-binding under den indledende autolyse, er højere end af de proteiner, som fikserer heparinet ved denatureringen og den efterfølgende isolering ved filtrering.

Hver af tre prøver bestående af 2 kg frisk svinetyndtarm med 17,3 vægt-% tørstofindhold blev fortyndet med 3 liter vand. Temperaturen blev indstillet til 29,5 °C, og den første prøve blev forarbejdet uden autolyse, den anden efter 6 timers autolyse, og den tredje efter 18 timers autolyse. Forarbejdningen blev udført ved opvarmning af organsuspensionerne til 93 °C under blanding og filtrering efter en hvileperiode på 5 minutter. Vægt og tørstofindhold af de denaturerede organer, som blev tilbage på filtret, såvel som volumen, tørstofindhold og heparinkoncentration af det udtømte filtrat blev målt.

Uden autolyse blev der opnået 1,37 kg denatureret organ med 22,8 % tørstofindhold ud fra de 2 kg frisk svinetyndtarm, filtratets rumfang var 3670 ml, tørstofindholdet 0,82 vægt-%, og heparinaktiviteten under 1,25 IE/ml. Efter autolyse i 6 timer var vægten af det opnåede denaturerede organ 1,18 kg og tørstofindholdet 23,2 %, filtratets volumen var 3780 ml, tørstofindholdet 1,72 %, og heparinaktiviteten 1,25 IE/ml. Efter autolyse i 18 timer blev der opnået 0,99 kg denatureret organ med 24,1 % tørstofindhold, filtratets volumen var 3980 ml, tørstofindholdet 2,43 %, og heparinaktiviteten under 1,25 IE/ml.

Eftersom der ikke forekom noget tab af heparin under handlingerne var heparinindholdet af det oprindeligt an-

vendte organ 118 000 IE, således at der ved længere auto-lyse kunne fremstilles et mere og mere heparinkoncentre-ret råmateriale.

- 5 Resultatet af forarbejdningen er vist i den efterfølgende tabel 1:

10

15

20

25

30

35

TABEL 1

Udgangsmateriale og forarbejdnings- metode	Vådvægt af organet g	Tørstof- indhold %	Totalt tørstof- indhold g	Totalt heparin- indhold IE	Heparinindhold IE/g tørstof
Ubehandlet tyndtarm	2000	17,3	346	118 000	342
Denatureret tyndtarm	1370	22,8	312	118 000	380
Tyndtarm efter 6 timers autolyse, og denatureret	1180	23,2	274	118 000	434
Tyndtarm efter 18 timers autolyse, og denatureret	990	24,1	238	118 000	500

EKSEMPEL 3

5 Dette eksempel viser, at slimhinden fra svinetyndtarm kan tørres i det intermitterende system uden tab efter denaturering.

10 260 kg våd slimhinde fra svinetyndtarm med 6,4 % tørstofindhold fra tarmrensemaskinen opsamles i homogeniseret tilstand. Der udtages en 10 kg prøve til yderligere sammenligningsforsøg (prøve A), og derpå opvarmes materialet under omrøring til 85 °C i løbet af kort tid i en indretning, som er egnet til direkte indførelse af damp. Efterhånden som man nærmede sig sluttemperaturen, blev omrøringsintensiteten reduceret. Efter at man havde nået 85 °C, fik materialet lov at hvile i 15 minutter, hvorved denatureringsprocessen blev fuldført.

20 Materialet, som var koaguleret i form af et smuldrende bundfald, blev ført fra indretningen til metalsigter med 1,2 mm maskevidde, og der blev udskilt gullige heparinholdige koagulerede korn. Efter filtrering fik det frafilterede materiale lov at hvile i en time, mens det blev gennemblandet flere gange for at intensivere afvandingen. Der blev opnået 62 kg heparinholdigt koaguleret materiale med relativt mindre fedtindhold end det oprindelige materiale, selv om en vis del af fedtet igen er blevet bundet på bundfaldets store overflade under filtreringsprocessen. Tørstofindhold af det koagulerede produkt: 23,4 %.

30 Heparinaktiviteten af den prøve, der blev taget fra filtratet, er under 0,9 IE/ml, tørstofindholdet 0,88 %. Hvad angår sammensætningen, blev den fundet at indeholde fedt, uopløselige og opløselige proteiner, nogle peptider og polypeptider, uorganiske salte og nogle andre inerte komponenter.

Denaturerede prøver B, C og D på hver 10 kg blev taget fra det forarbejdede udgangsmateriale.

5 Prøve B blev i en filterpresse komprimeret i en lagtykkelse på 1,5 cm. Som resultat af presningen blev der opnået 7,4 kg produkt med 30,3 % tørstofindhold. Hvis det ved presningen anvendte lag er tykkere, så vil presningseffektiviteten blive lavere.

10 Prøve C blev delt i to lige store dele (prøve C_1 og C_2). Prøve C_1 med en lagtykkelse på 0,5 cm blev tørret i en udluftet exsiccator ved 90 °C i 1 1/2 døgn. Der blev opnået 1,31 kg produkt med 88 % tørstofindhold, som blev findelt i en mølle og i det følgende betegnet C_{11} . Prøve
15 C_2 blev ikke tørret.

Parallelle ekstraktionsforsøg blev gennemført med prøverne A, C_2 og C_{11} til sammenligning af det ekstraherbare heparinindhold.

20 For at lette den talmæssige sammenligning svarede den mængde af hver prøve, som blev forarbejdet, til 0,468 kg tørstofindhold. I overensstemmelse hermed blev der forarbejdet 7,31 kg af prøve A, 2,0 kg af prøve C_2 og 0,532 kg
25 af prøve C_{11} .

Med henblik på ensartethed af de sammenlignende ekstraktionsprocesser blev der ud over identisk tørstofkoncentration også anvendt identiske reagensforhold. Ekstraktionsblandingens volumen blev fortyndet med ledningsvand
30 til 8,0 liter, hvilket krævede 690 ml ledningsvand til prøve A, 6000 ml til prøve C_2 og 7470 ml til prøve C_{11} .

De yderligere arbejdsstrin i ekstraktionen var følgende:

35 385 g ammoniumsulfat blev sat til den vandige blanding under konstant omrøring, hvorefter blandingen blev opvar-

met til 60 °C. Ved denne temperatur blev der indstillet en pH-værdi på 10,0 med natriumhydroxid, og for at indstille ekstraktionsligevægten blev den førnævnte temperatur opretholdt i 2,5 timer. Efter 2,5 timer under konstant omrøring blev pH-værdien sænket til 8,2 ved tilsætning af fast ammoniumchlorid, og derpå blev blandingen opvarmet til kogepunktet. Efter kogning i 5 minutter fik blandingen lov at hvile i 10 minutter, og derpå blev organrester adskilt fra ekstraktionsvæsken på en metalrammesigte med maskevidde 1,0 mm. En prøve blev udtaget fra organresterne på filtret, og tørstofindholdet blev målt for at bestemme mængden af ekstraktionsvæske, som var til stede i organresterne. Udbyttet beregnet som det heparinindhold, der blev fundet i prøverne, på basis af den oprindelige begyndelsesvægt var følgende:

Prøve A

	heparinindhold	126000 IE
20	materialeforhold	58,2 kg organ/ 10^6 IE

Prøve C₂

	heparinindhold	148500 IE
25	materialeforhold	13,5 kg organ/ 10^6 IE

Prøve C₁₁

	heparinindhold	162500 IE
30	materialeforhold	3,27 kg organ/ 10^6 IE

Den sammenlignende analyse af de ovenstående resultater er anført i tabel 2 efter eksempel 4.

EKSEMPEL 4

5 Tyndtarmslimhinde med 6,3 % gennemsnitligt tørstofindhold fra tarmrensemaskinen som i eksempel 3 sendes igennem en isoleret rørsektion med fremføringspumpe. Der indstilles en opholdsperiode på 1,5 time ved 41 °C i udstyret.

10 Det autolyserede rå dyreorgan blev forarbejdet i et kontinuert system med det udstyr, der er beskrevet i dansk patentskrift nr. 154. 005. I lynopvarmningsenheden blev organblandingen opvarmet til 90 °C ved direkte indførsel af damp og blev derpå behandlet under langsom strømning i 7,5 minutter i den spiralformede varmeisolerede rørsektion, som hører til udstyret. De koagulerede korn blev 15 skilt fra i en filtertromle af typen forsynet med skrue-transportør og med lukket damprum. Den med skruetransportør forsynede filtertromle sikrer fremføring af det frafiltrerede heparinholdige råmateriale fra filterenheden under kontinuert filtrering.

20 Det frafiltrerede produkt leveres igennem et fødesystem ind i det med filtrene forbundne, horisontalt anbragte, cylindriske tørringsudstyr, der opvarmes udvendigt med damp, indvendigt med varm luft, og er forsynet med blander og valser. Den kontinuerede tørring af produktet i 25 dette udstyr gennemføres på en sådan måde, at den varme luft, som produceres i en separat luftopvarmningsenhed, hvori luften suges ind fra omgivelserne af en ventilator, dampopvarmes til 142 °C. Temperaturen af den udgående våde luft er indstillet til 82-88 °C. 30

Udgangsråmaterialet blev tilført med hastigheden 600 l/h, og efter kørsel af udstyret i 6 timer blev der opnået 178 kg næsten fedtfrit produkt med 90,4 % tørstofindhold og 35 et kimal på 10^2 - 10^3 /g. Kornstørrelsesfordelingen af det opnåede produkt er sådan, at det kan opbevares ved stuetemperatur i ubeskadiget tilstand i et ubegrænset tids-

rum, 80 % af kornene er i størrelsesområdet 1,6-0,2 mm.

En prøve blev taget fra filtratet hver halve time, og tørstofindholdet, heparinindholdet og indholdet af vigtige kemiske komponenter blev prøvet. Det gennemsnitlige tørstofindhold var 1,41 %, heparinaktiviteten var under 0,92 IE/ml, og filtratet indeholdt en væsentlig mængde fedt, mindre uopløseligt og opløseligt protein end det isolerede filtrat i eksempel 1, men en større mængde peptider og polypeptider såvel som uorganiske salte og inerte urenheder.

Det ved autolyse opnåede produkt muliggør fremstillingen af et heparinberiget råmateriale. Det tørrede råmateriale i eksemplet, prøve E, forarbejdes ved ekstraktion i de mængder og forhold, som er anført i eksempel 3.

Sammensætningen af prøverne ifølge eksemplerne 3 og 4 og forsøgsresultaterne er sammenfattet i tabel 2.

For at opnå en nøjagtig sammenligning blev der udregnet to typer heparinindhold og tre typer materialeforholdsværdier. Udregningen af de to typer heparinindhold er nødvendig, fordi den anvendte ekstraktionsmetode var en enkelt intermitterende ekstraktion, hvori organresterne, der forblev på sigten i forskellige mængder under fraskillelsen af ekstraktionsvæskerne - hvis man går ud fra, at der var ligevægt - indeholdt ekstraktionsvæske af samme koncentration som den filtrerede ekstraktionsvæske. Det bemærkes, at dette heparinindhold er teoretisk opnåeligt ved gentagen ekstraktion. Den værdi, som er anført i spalte 9, er den faktisk opnåede værdi udregnet på basis af værdien af de filtrerede ekstraktvæsker, mens de såkaldte teoretiske værdier angivet i spalte 13 repræsenterer de teoretisk opnåelige heparinindhold udregnet under hensyntagen til indholdet af ekstraktvæske i organresten. Ekstraktvæskeindholdet af hver organrest er vist i tabel-

lens spalte 12. På basis af disse værdier kan det sluttes, at hvis man forøger tørstofindholdet af det råmateriale, som skal forarbejdes, reduceres ekstraktionsvæskeindholdet af organresten, dvs. ekstraktionsprocessen kan gennemføres mere effektivt ud fra råmateriale med højere tørstofindhold, selv i tilfælde af flere gentagne ekstraktioner. Materialeforholdsværdier, som er angivet i tabellens spalte 10, blev udregnet på basis af den faktiske tilførte vægtmængde vist i spalte 6 og det opnåede heparinindhold vist i spalte 9. Værdierne udregnet i spalte 11 repræsenterer data for de førstnævnte i forhold til 100 % tørstofindhold (spalte 6). De såkaldte materialeforholdsværdier udregnet i spalte 11 svarer til værdierne i forhold til 100 % tørstofindholdet (spalte 6) baseret på det teoretiske heparinindhold (spalte 13). På basis af dataene i spalte 6 og 13 kan heparinindholdet af produkter, som er ekstraherbare ved en given fremgangsmåde, opnået med og uden autolyse, sammenlignes. Det kan ses af tabellen, at materialeforholdsværdien af de denaturerede og tørrede produkter er næsten identisk med værdien i de produkter, der er forarbejdet uden autolyse, og i sammenligning med den rå svinetyndtarmslimhinde er den ca. 10 % bedre. Under denatureringsprocessen kan flere inerte materialer fjernes med filtratet. I tilfælde af indledende autolytisk berigelse af heparinindholdet er den meget højere, ca. 30 %, i sammenligning med det friske organ.

Tabellerne fører til den konklusion, at heparinindholdet af det denaturerede og tørrede råmateriale opnået via autolyse udregnet på basis af samme tørstofindhold er væsentligt højere end af heparinråmaterialet forarbejdet uden autolyse. Sammenligningsforsøgene beviser, at tørringen ikke forårsager nedbrydning af heparinet.

Den fremstillede hidtil ukendte type råmateriale kan forarbejdes ved konventionelle ekstraktionsmetoder til et

heparinprodukt, udfra hvilket der kan fremstilles et slutprodukt af terapeutisk kvalitet.

5

10

15

20

25

30

35

TABEL 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prøve	Materialiets type	Indledende autolyse	Tørstof	Forarbejdet mængde tørstof	Rumfang	Ekstraktionsvæske Heparinkoncentration	Heparinindhold	Materialerforhold for oprindelig vægt	for 100% organisk tørstof	Organres-tens indhold af ekstraktionsvæske	Teoretisk heparinindhold for 100% organisk tørstof		
A	rå slimhinde	-	6,4	7,31	468	ml	IE/ml	IE	kg/10 ⁶ IE	kg/10 ⁶ IE	ml	IE	kg/10 ⁶ IE
						6120	20,6	126000	58,2	3,72	1740	162000	2,89
C ₂	denatureret slimhinde	-	23,4	2,0	468	6600	22,5	148500	13,5	3,16	1340	179500	2,62
C ₁₁	denatureret tørret slimhinde	-	88,0	0,532	468	7030	23,1	162500	3,27	2,88	860	182000	2,57
E	autolyseret denatureret tørret slimhinde	+	90,4	0,518	468	7120	28,6	204000	2,54 ¹	2,29	900	229000	2,04

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et heparinholdigt
5 råmateriale ud fra heparinholdige animalske organer,
hvilket råmateriale har en konstant sammensætning med
højt indhold af heparin og lavt fedtindhold og kimalt og
kan opbevares uden ændring i morfologien og heparinind-
holdet, k e n d e t e g n e t ved, at de heparinholdige
10 animalske organer om nødvendigt efter hakning suspenderes
i vandigt medium, og lagres i det vandige medium ved 10-
50 °C i 0,5-15 timer, hvorefter et i vand uopløseligt he-
parin-protein-holdigt kompleks udfældes fra den autoly-
serede suspension ved opvarmning til 75-100 °C og omdan-
15 nes til let filtrerbare aggregater ved fortsat varmebe-
handling, bundfaldet skilles fra, og det isolerede hepa-
rinholdige råmateriale tørres, fortrinsvis ved en tempe-
ratur under 100 °C, indtil der er opnået et smuldrende
holdbart produkt med 90-95 % tørstof.
20
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at der anvendes animalske organer hakket til dele på
4-6 mm.
- 25 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t
ved, at de animalske organer lagres i våd suspen-
sion med 1,5-17 % tørstofindhold.
4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de forudgående krav,
30 k e n d e t e g n e t ved, at de hakkede animalske orga-
ner suspenderes i vand med en temperatur på 36-42 °C.
5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de forudgående krav,
k e n d e t e g n e t ved, at autolysen gennemføres ved
35 en temperatur i området 30-50 °C i 4-6 timer.

6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de forudgående krav, k e n d e t e g n e t ved, at den autolyserede suspension lypopvarmes i et kontinuert system til en temperatur mellem 75 og 100 °C, hvorpå der gennemføres yderligere
5 varmebehandling i det samme temperaturområde i 12-15 minutter.

7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at den autolyserede suspension opvarmes intermitterende til 75-100 °C på den kortest muli-
10 ge tid og varmebehandles ved den samme temperatur i 12-15 minutter.

8. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-6, k e n d e t e g n e t ved, at det ved varmebehandlingen udskilte heparin-protein-holdige kompleks med 20-25 %
15 tørstofindhold isoleres i en mekanisk separator, som fungerer ved hjælp af tyngdekraften, og det inaktive filtrat smides væk.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en mekanisk separator med lukket
20 damprum og med en regenereret filteroverflade.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et kontinuert tørringsudstyr.
25

11. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den udføres intermitterende.
30