



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

208735

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³

C. 08 B 37/10

(22) Přihlášeno 07 11 77

(21) (PV 7263-77)

(32) (31)(33) Právo přednosti od 12 11 76
(P 26 52 272.5) Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 30 01 81

(45) Vydáno 15 09 84

(72) Autor vynálezu

VIDIC HANS-JÖRG dr., ZÁPADNÍ BERLÍN (Západní Berlín)

(73) Majitel patentu

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, ZÁPADNÍ BERLÍN (Západní Berlín)

(54) Způsob výroby čistého heparinu

1

Vynález se týká způsobu výroby heparinu ze solného roztoku, který vzniká solením zpracovávaných zvířecích střev.

Heparin již dlouho slouží v medicíně jako přírodní antikoagulační prostředek, který je jako dříve nepostradatelný i v moderní medicíně a je stále ve velkém rozsahu používán.

V posledních letech byla poznána řada způsobů, které všechny měly za cíl izolovat účinnou látku heparin šetrným způsobem ze zvířecích tkání heparin obsahujících, jako z plic, jater a v novější době především ze střevního slizu vepřů, hovězího dobytka a ovcí (britský patent 754 885, DE patentový spis 1 228 241, US patent 3 058 884, DE patentový spis 1 253 868). Tyto suroviny jsou nevýhodné tím, že mají omezenou schopnost skladování, jelikož se snadno kazí. Skladovatelnost se sice může prodloužit zmrazováním, to však vedle technických nákladů vede i ke značnému vzrůstu výdajů. Při zpracování jsou jak provozní zaměstnanci, tak také okolní obyvatelstvo nezdůvodněně postaveni před nepříjemné problémy způsobené zápachem.

V německém patentovém spise 1 253 868 se popisuje získávání heparinu několika shrnutými obvyklými způsoby. Podle toho se zvířecí tkáň v počátečním stupni uvede do styku s horkým vodným roztokem soli a heparin se vyluhuje z buněk. Heparinový podíl v tomto prostředí je zvláště malý.

Nyní bylo nalezeno, že solný roztok vznikající na jatkách a při čištění střev od slizu obsahuje heparin. Tento solný roztok vzniká, když se zvířecí střeva zbavená střevního slizu prosypávají za účelem konzervace a odvodnění pevnou kuchyňskou solí. Je proto s přihlédnutím k DE patentovému spisu 1 253 868 možno vyložené překvapivě konstatovat, že

208735

solný roztok vznikající při pouhém nasolení zvířecích střev obsahuje větší množství heparinu. Nemohlo se také očekávat, že tento heparin je přítomen téměř zcela bez chemicky příbuzných vedlejších produktů, takže solný roztok, který byl dosud znám jako otižný odpadní produkt, představuje surovinový zdroj heparinu.

Vzhledem ke zcela nepatrnému množství nečistot je možno zpracování na surový heparin provádět zvláště šetrně a tím odpadají nákladné izolační metody, známé u dosavadního stavu techniky (viz US patent 3 451 996 a britský patent 1 221 784). Dosáhne se nakonec kvality heparinu, které se zdaleka nedosahuje u heparinových přípravků získatelných na trhu. Surový heparin izolovaný známými pracovními postupy ze solných roztoků po solení střev podle vynálezu se získává již v takové čistotě, že následující čištění vede k heparinů s hodně přes 200 jednotek podle zkoušky předepsané US lékopisem/mg.

Heparinové přípravky získatelné dosud v obchodě mají zpravidla kvalitu heparinu 150 jednotek/mg podle zkoušky předepsané US lékopisem, v několika málo případech i 155 jednotek/mg. Přitom se jako jednotka/mg podle US lékopisu rozumí specifická aktivita, která vyplývá ze zkoušky podle US lékopisu, kterou se měří potlačení tvorby klčků konzervované ovčí plazmy. 1 jednotka podle US lékopisu odpovídá 1,1 mezinárodní jednotky.

Poněvadž hodnoty aktivity heparinových přípravků nacházejících se v obchodě jsou přes početná výrobní zlepšení stále neuspokojující, předpisuje například US lékopis, že heparinové přípravky (ze střevního slizu) musí obsahovat nejméně 140 jednotek podle US lékopisu. Pouze v laboratoři izoloval L. W. Kananagh a L. B. Jaques [Arzneimittelforschung (Drug Res.) 24, č. 12, 1942 (1974)] heparin opakovanou krystalizací jako barnatou sůl s maximálně 175 jednotkami/mg podle US lékopisu.

Použitím solného roztoku získaného po nasolení střev podle vynálezu jako suroviny se izoluje heparin v technickém měřítku, v takové čistotě, že je jako téměř bezbarvá substance. Surový heparin získávaný dodnes z jiných surovin se naproti tomu musí nejdříve odbarvovat nákladnými a na ztráty bohatými postupy.

Solný roztok je mimo to skladovatelná surovina, téměř bez zápachu, která i při dlouhém skladování zůstává bez újmy na kvalitě. Tím odpadají chemické a jiné konzervační metody.

Předmětem vynálezu je tedy použití solného roztoku vzniklého nasolením střev jako zdroje suroviny pro výrobu heparinu, jakož i způsob izolace zvláště čistého heparinu ze solných roztoků zvířecí tkáně známým způsobem, vyznačený tím, že se jako výchozí materiál používá solný roztok vzniklý solením střev.

P ř í k l a d 1

K roztoku 600 litrů solného roztoku vzniklého solením střev se v 1 500 litrové míchačce, při teplotě místnosti, za míchání přidá během půl hodiny 600 litrů methanolu. Míchá se ještě půl hodiny, načež se směs nechá asi hodinu stát.

Zakalený podíl se dekantuje do druhé nádoby a vypadlý solný koláč se odstraní. Získaná suspenze se nechá dva dny stát. Pak se znovu dekantuje a sraženina se izoluje odstředěním. Po usušení ve vakuu se získá 1,68 kg produktu, který má 11 jednotek podle US lékopisu/mg. Ještě 60 % tvoří kuchyňská sůl.

P ř í k l a d 2

Podobně britskému patentu 754 885 se 3 litry solného roztoku za míchání okyselí kyselinou octovou na pH 3,1 až 3,2 (asi 50 ml). Po několika hodinách se dekantuje a zbytek se odstředí. Sraženina se odstraní a spojené roztoky se neutralizují louhem sodným. Nyní se

za míchání pomalu přidá stejná objem methanolu. Po 45 minutách se oddekantuje vypadlá kuchyňská sůl. Tato suspenze se nechá několik hodin stát, dekantuje se a zbytek se odstředí. Sraženina se suší ve vakuu. Získá se 3,76 g s 23 jednotkami podle US lékopisu/mg.

P ř í k l a d 3

3 litry solného roztoku se zředí 14 litry vody. Potom se přidá 50 g křemeliny, jakož i roztok 7 g benzethoniumchloridu (= Hyamin 1622, Rohm a Haas) ve 100 ml vody. Po několika hodinách se dekantuje a zbytek se odsaje. Po promytí vodou se ještě vlhká sraženina třikrát extrahuje vždy 200 ml 2 molárního roztoku kuchyňské soli, postupem popsaným v DE patentním spise 1 228 241. Spojené extrakty se vysrážejí 2 objemovými díly methanolu. Izolovaná a usušená sraženina váží 560 mg a má aktivitu 163 jednotek podle US lékopisu/mg.

P ř í k l a d 4

3 litry solného roztoku se za míchání okyselí kyselinou octovou na pH 3,1 až 3,2. Po několika hodinách se dekantuje a zbytek se odstředí. Spojené roztoky se zředí vodou na objem 15,5 litru a přidá se 40 g křemeliny, jakož i 7 g benzethoniumchloridu (Hyamin 1622) ve 100 ml vody.

Po několika hodinách se sraženina izoluje, jak popsáno v příkladu 3, a dále se zpracuje.

Nakonec se obdrží 796 mg se 105 jednotkami podle US lékopisu/mg.

P ř í k l a d 5

3 litry solného roztoku se zředí 13 litry vody (srovn. DE patentový spis 1 156 938). Potom se kyselinou octovou okyselí (asi 50 ml) na pH 3,2. Po několika hodinách se usadí sraženina, která po dekantaci čirého podílu se odstředí. Po usušení se získá 16,6 g surového heparinu s 5,5 jednotkami podle US lékopisu/mg.

P ř í k l a d 6

10 litrů solného roztoku se zředí 50 litry vody. Roztok se prosává filtrem přes ionoměničový sloupec o průměru 26 mm a délce 380 mm (asi 3 l/h). Použije se středně bazická makroporézní anionoměničová pryskyřice v Cl-formě (Lewatit CA 9249). Mohou se použít i jiné anionoměničové pryskyřice, jako například Dowex X-1, popsaný v DE patentovém spise 1 253 868.

Potom se pryskyřice ze sloupce odstraní, dvakrát se promyje 500 ml 0,9 molárního roztoku kuchyňské soli a při 40 °C se 5 hodin eluuje 400 ml 2 molárního roztoku kuchyňské soli. Tento roztok se sráží 1,5 objemovými díly methanolu. Izolovaná a usušená sraženina váží 1,5 g a má 152 jednotek podle US lékopisu/mg.

P ř í k l a d 7

Alikvotní část surového heparinu z příkladu 1, odpovídající 425 000 jednotek podle US lékopisu, popřípadě 38,65 g, se třikrát extrahuje vždy 200 ml dvoumolárního roztoku kuchyňské soli, přičemž se vždy hodinu míchá při 60 °C. Spojené extrakty se zředí vodou, až roztok obsahuje asi 0,9 M/l chloridových iontů. Nyní se přidá 200 ml anionoměniče (Lewatit CA 9249) v chloridové formě a hodinu se míchá. Potom se odsaje a promývá se asi 200 ml 0,9 molárního roztoku kuchyňské soli.

Ionoměnič se pak pět hodin míchá s dvoumolárním roztokem kuchyňské soli při 40 °C, pak se odsaje a znovu promývá dvoumolárním roztokem kuchyňské soli. Eluační roztok se spojí s pro-

mývacím roztokem a sráží se 1,5násobným objemem methanolu. Sraženina se odstředí, promyje se nejdříve asi 50 ml voda-methanol (1 + 1,5 objemového dílu), potom ca 50 ml methanolu a suší se.

Získá se 1,91 g Na-heparinátu s 202 jednotkami podle US lékopisu pro mg.

Příklad 8

15 g heparinátu sodného, získaného podle příkladu 7, s asi 200 jednotkami podle US lékopisu pro mg, se rozpustí ve 200 ml dvoumolárního roztoku kuchyňské soli. Roztok se prosaje na nuči a zbytek se promyje nejprve 30 ml dvoumolárního roztoku kuchyňské soli a potom asi 250 ml vody úplně zbavené soli. Spojené roztoky se vodou úplně zbavenou soli upraví na chloridovou molaritu 0,9. Čištění se pak opakuje s litrem Lewatitu CA 9249 analogicky příkladu 7.

Spojený eluační a promývací roztok se dále zpracuje, jak uvedeno výše. Po promytí a usušení sraženiny se získá 11,1 g heparinátu sodného, který má aktivitu 254 jednotek podle US lékopisu pro mg.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby čistého heparinu, vyznačený tím, že se solné roztoky získané nasolením střev poražených zvířat pevným chloridem sodným při 0 až 30 °C zředí vodou v hmotnostním poměru solný roztok - voda 1 ku 3 až 1 ku 10 a pak se ze zředěného, heparin obsahujícího roztoku heparin oddělí.