

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
C08B 37/10



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98807195.9

[43] 授权公告日 2003 年 5 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1109048C

[22] 申请日 1998.7.9 [21] 申请号 98807195.9

[30] 优先权

[32] 1997. 7. 16 [33] EP [31] 97202213.1

[86] 国际申请 PCT/EP98/04939 1998.7.9

[87] 国际公布 WO99/03893 英 1999.1.28

[85] 进入国家阶段日期 2000.1.13

[71] 专利权人 阿克佐诺贝尔公司

地址 荷兰阿纳姆

[72] 发明人 F·E·A·范豪邓霍文

A·L·M·森德斯

P·J·J·范朱特芬

[56] 参考文献

GB2045271A 1980.10.29

UD5164377 1992.11.17

US4216293 1980.08.05 C07G7/00

US5607840 1997.03.04 C12P21/06

审查员 朱 芳

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 郭建新

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 生产肝素的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种从动物粘膜组织提取肝素的简化方法。该方法包括：一个在室温下原料的酶解步骤，接着在 50 ~ 75℃ 的温度下水解至多 6 小时。温度的升高是通过简易方法达到的。在冷却到室温的同时可以将该消化混合物进一步保温。肝素是从存在于蛋白质水解物中的阴离子交换剂回收的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种采用酶解哺乳动物粘膜组织的蛋白质的方法而生产肝素的方法，包括如下相继的步骤：

(a) 将一种蛋白酶加到所述粘膜组织中；

(b) 在室温下将步骤(a)中获得的混合物搅拌2~8小时；

(c) 将该混合物的温度升高到50~75℃达1~6小时。

2. 权利要求1的方法，其中步骤(c)进行1~4小时。

3. 权利要求1的方法，其中步骤(c)中的温度为60~70℃。

4. 权利要求1的方法，其中步骤(c)中所述温度的升高是通过将1~3体积的温度在80~100℃之间的水性溶剂加到所述混合物中而达到的。

5. 权利要求4的方法，其中所述水性溶剂是沸水。

6. 权利要求1的方法，其中让步骤(c)之后的混合物冷却到室温。

7. 权利要求1的方法，其中在步骤(a)、(b)或(c)的至少一个步骤中将一种吸附剂加到所述混合物中，该吸附剂的用量足够结合存在于所述混合物中的肝素。

8. 权利要求7的方法，该方法进一步包括：过筛出含肝素的吸附剂，再从吸附剂中回收肝素。

生产肝素的方法

本发明涉及肝素的制备。更具体地说，它涉及除去存在于动物组织肝素来源中的蛋白质的简化方法。

肝素是一种很复杂的糖胺聚糖，它包括通过 α (1—4)键和 β (1—4)键连接的糖醛酸和 α -D-葡萄糖胺的不同硫酸化残基的交替序列。由于它的一级结构的复杂性，所以肝素是多分散的杂多糖，它在分子量、物理化学性质和生物活性方面是有很大不同的。

肝素已长时间被用作治疗和预防静脉血栓形成的抗凝剂和抗血栓形成剂。它存在于多种动物组织中，并且可通过从其中分离而得。目前，用于这些用途的大部分肝素是从猪肠粘膜分离的。分离方法包括粘膜的水解，接着提取肝素。

美国专利 5,607,840(并入本文作参考)描述了一种水解粘膜组织的方法。该方法包括：在约 55℃ 的温度下用蛋白酶水解含哺乳动物粘膜的含水混合物，将聚阴离子吸附到阴离子交换树脂上，接着从该树脂回收阴离子并从消化的水溶液回收蛋白质水解物。为了稳定粘膜原料和防止细菌生长，将呈氧清除剂或杀菌剂形式的盐掺入所述溶液。

含粘膜的水性介质中肝素含量很低，所以必需处理大量粘膜组织。因此，为经济起见，该水解作用是在大于 50m³ 的反应器中进行的。在反应期间，将温度保持在恒定值达 24 小时以上，并且应用先进的装置强烈搅拌所述混合物。

通常，肝素提取工厂离收集粘膜的屠宰场相距不是一段短距离，这就需要长距离运输。尤其是在遥远的地方这样会导致给生产厂运送低质量原料以及成本的增加。

本发明提供了一种从粘膜组织分离肝素的新的、简易的方法。已发现，处于包括哺乳动物粘膜组织的含水混合物中的蛋白质也可用蛋白酶在 50~75℃ 的温度下消化至多大约 6 小时。可任选包括一个在室

温下简单的“预水解”步骤。证实了这样可大为改善蛋白酶解效率。温度升高后，可以优选在聚阴离子吸附物质的存在下在低于 50℃ 的温度下继续水解。消化可在具有适中容量的容器内进行。

所以，本发明的方法包括如下步骤：将粘膜的温度升到大约 50~75℃，在蛋白酶存在下在该温度范围内将粘膜保温至多大约 6 小时。

该方法的优点是它可在较小规模下进行。该方法很适合在生产粘膜原料的地方进行，所以不需运输原料。此外，不需特别的技术。

按本发明，还可在该方法中包括如下保温步骤的一步或两步：

a) 在温度升高前，在室温下的容器中将所述混合物保温至多大约 8 小时，

b) 在温度升高后，在让所述溶液冷却到室温的同时进一步保温。

在 50~75℃ 下的保温时间优选少于 4 小时。优选地，保温时间多于 1 小时。优选将温度升高到大约 60~70℃。

可以容易地通过直接加热盛有粘膜水溶液的容器而升高温度。例如，约 60~70℃ 的温度可以用普通煤气火焰但也可以例如通过蒸汽而迅速地达到。这样获得的温度可通过缓缓加热数小时保持。备选地，可在刚达到所需的温度时就停止外部加热，让容器内的混合物逐渐地冷却。由于温度逐渐降低，所以混合物将保持其温度在 50℃ 以上达数小时。这样，在高于 50℃ 的温度下发生蛋白质水解。在移去外部热源后，温度降低，水解在更低温度下继续进行。对在降低了的温度下保温时间的长短没有限制，但是，保温时间少于 24 小时是优选的，更优选地进行保温一夜。在室温下继续延时保温并不是必需的，但已证实延时保温对肝素产率有影响。同样，证实了室温下的“预保温”步骤可改善肝素产率。

反应容器例如可以是钢容器，但不需特别的要求。

备选地，可通过添加 1~3 体积的温度在 80~100℃ 之间的水溶液来升高温度。优选地应用水但还可应用稀盐溶液。优选地，水温度是沸腾温度。由于体积扩大了，热容也增大了。因此可将温度保持在所需温度达足够长的一段时间，同时冷却过程缓慢地进行。添加水的另

一个优点在于溶液粘度减小了，导致吸附剂—肝素复合体更好的筛分性能，这在肝素的提取中是重要的。由于不需要直接加热，所以可应用不同原料(例如塑料)的容器。

实施本发明的操作的一种便利方式是在工作日收集粘膜，并通过在容器内贮存原料期间添加蛋白酶而开始水解。到了工作日末，温度可被升高到 50~75℃，任选保持恒定的值达数小时，然后进一步保温一夜，同时温度逐渐地降到室温。

优选的是，在水解过程中搅拌所述混合物以便获得均匀的溶液并且使吸附剂与含肝素的溶液之间保持良好的接触。

含粘膜的溶液可通过将动物组织分散于水中而获得。组织例如可从牛、狗、猪和羊得到。组织具有内皮组分和粘膜组分。肝素例如存在于多种动物的肺、肠、皮肤和肝内。优选地，应用得自猪的肠粘膜。

在该方法中可应用多种酶，只要它们具有蛋白水解活性即可。合适的酶是本技术中熟知的，例如微生物蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶。应用于碱水解中的合适的酶是以商标 maxatase®可商购的。酶与底物的比率通常约为 0.02~0.2%。在本发明的操作中还可添加通常存在于粘膜组织溶液中的防腐剂。优选地，应用焦亚硫酸钠作为防腐剂，但其它防腐剂(例如丙酸钙或苯酚)也能符合需要。要添加的亚硫酸氢盐的量约为 0.5~5kg/100 升粘膜。防腐剂最好是在粘膜组织的收集过程中添加。

可用碱性试剂将 pH 调节到 pH7~9。通常以大约 0.8~1.2kg/100 升粘膜的量添加氢氧化钠。最常用的蛋白酶在该 pH 时发挥它们的最佳活性。可以在“预水解”步骤中以及在更高温度下的保温步骤中进行调节。

本发明还有一个目的是提供分离肝素的方法。本发明的水解方法在肝素的分离中是重要的。如果在一个或多个保温步骤中将吸附剂加到所述混合物中结合存在于水解液中的肝素，就可从水解产物中提取肝素。优选地，在更高温度的保温开始时添加吸附剂。

所述吸附剂优选是阴离子交换树脂，它以足够结合粘膜溶液中存

在的聚阴离子的量被添加。这类阴离子交换树脂是可商购的。通常添加的量是2升/100升粘膜。还可应用对肝素有专一性的亲和吸附剂从消化液提取肝素。

应在一定范围内选择水解产物的总盐浓度以保证所述树脂的几乎定量吸附,这对于聚阴离子同离子交换树脂的结合效率是重要的,并且通常在0.1~0.5摩尔浓度之间变动。除了粘膜中存在的盐外,通常还在水解过程中添加防腐剂和碱金属盐或铵盐。

在水解过程之后过筛出吸附剂。然后通过高盐溶液洗脱吸附的肝素并将肝素进一步处理。所以,本发明的又一个目的是提供一种分离肝素的方法,该方法包括如下进一步的步骤:过筛出含肝素的吸附剂,再从该吸附剂洗脱肝素。

为了保障最佳回收肝素,希望用于洗脱的盐溶液具有足够高的离子强度以保证从吸附剂基本上全部释放肝素。从肝素-阴离子交换复合体回收肝素的一种方法是用浓度为2~4摩尔的NaCl洗脱。

应明白,本发明的方法使得有可能处理未吸附的原料(即处于生产场所的粘膜),因为该方法容易实施并且只需最小装置来进行水解。因此,本发明的操作甚至可在低技术环境中用差的基本结构来进行。

如下实施例阐释了本发明,决不能认为是限定本发明的范围。

实施例

实施例 1

往250kg用0.5%焦亚硫酸钠稳定了的猪粘膜中添加200克maxatase®并在室温下搅拌该混合物。4小时后用煤气火焰加热器在约70分钟内加热该粘膜至69℃。添加NaOH(1500克)使pH为7.3,再添加3.5升阴离子交换剂。然后让该混合物在搅拌下冷却一夜。为了便于离子交换剂的分离,第二天在过筛出离子交换剂之前加热该混合物。用3.5%盐溶液洗涤该离子交换剂,并用14%盐洗脱液洗脱。用甲醇沉淀洗脱的肝素。洗脱液中和沉淀物中肝素的产率分别是

36100U/kg 粘膜和 34300U/kg. 活性和质量比得上从标准方法得到的粗肝素。

实施例 2

往 100kg 用 1%焦亚硫酸钠稳定了的猪粘膜中添加 80 克 maxatase®并在室温下搅拌该混合物。2 小时后通过在大约 10 分钟内添加 120 升沸腾的热水将粘膜加热到 65℃。通过添加 630ml 33% NaOH 溶液改变 pH(测得的值是 7.3)，添加 3.5 升阴离子交换剂。起始温度是 65℃，一小时后是 61℃，两小时后是 56℃，三小时后是 52℃。让该混合物冷却一夜。在 28℃ 的温度下过筛出离子交换剂，洗脱洗涤过的离子交换剂。洗脱液中和沉淀物中肝素的产率分别是 30500U/kg 粘膜和 26400U/kg。活性和质量比得上从标准方法得到的粗肝素。

实施例 3

在 30℃ 的温度和搅拌下，往 47.5kg 用 0.5%焦亚硫酸钠稳定了的粘膜中添加 80 克 maxatase®。4 小时后又添加 55.5kg 粘膜，再在室温(26℃)下搅拌混合物 2 小时。然后通过往该混合物中通入热蒸汽在 40 分钟内将混合物加热到 65℃。用 550 克 NaOH 使 pH 变为 7.2，搅拌一小时后添加一升离子交换剂。起始温度是 65℃，一小时后是 62℃，两小时后是 53℃。让该混合物冷却一夜，温度是 27℃。洗脱液中和沉淀物中肝素的产率分别是 40000U/kg 和 38700U/kg。

实施例 4

往处于保温瓶中用 0.5%焦亚硫酸钠稳定了的 3kg 猪粘膜中添加 2.3 克 maxatase®并在室温下搅拌该混合物。在 30℃ 下 5.5 小时后，通过添加 5.4 升沸腾的热水将粘膜加热到 64℃。添加 35ml 33%NaOH 溶液使 pH 变为 7.6 并添加 110ml 阴离子交换剂。然后让该混合物冷却。在约 16 小时后温度是 41℃，过筛出离子交换剂。洗脱液中肝素产率是 32200U/kg 粘膜。活性和质量比得上从标准方法得到的粗肝

素。

实施例 5

往 115kg 用 1%焦亚硫酸钠稳定了的猪粘膜中添加 88 克 maxatase®并在室温下搅拌该混合物。2 小时后通过在大约 10 分钟内添加 133 升沸腾的热水将粘膜加热到 65℃。通过添加 880 克 NaOH 改变 pH (pH7.75), 添加 4 升阴离子交换剂。随后添加 108 克 maxatase®。起始温度是 65℃, 一小时后是 60℃, 两小时后是 57℃, 三小时后 54℃。3 小时后过筛出离子交换剂。洗脱洗涤过的离子交换剂并使肝素沉淀。肝素洗脱液含 20500U/kg 粘膜, 沉淀物中含 17565U/kg。活性和质量比得上从标准方法得到的粗肝素。

实施例 6

往 100kg 用 1%焦亚硫酸钠稳定了的猪粘膜中添加 maxatase®并在室温下搅拌该混合物。然后用煤气火焰加热器在 60 分钟内将粘膜加热到 68℃。添加 NaOH 使 pH 变为 7.2。随后添加 2.1 升阴离子交换剂。再将该混合物放置冷却直至温度低于 60℃, 然后又加热保持温度在 60℃ 以上。三小时后过筛出离子交换剂。将该离子交换剂洗涤后在 5℃ 下贮存供运送到加工厂。