



(12) PATENTSKRIFT

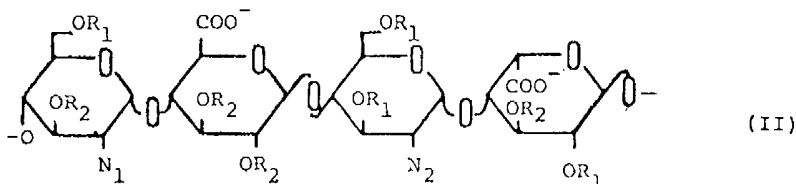
Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl.: C 07 H 11/00 C 07 H 3/06
 (21) Patentansøgning nr: PA 1985 02159
 (22) Indleveringsdag: 1985-05-15
 (24) Løbedag: 1985-05-15
 (41) Alm. tilgængelig: 1985-11-17
 (45) Patentets meddelelse bkg. den: 2002-11-11
 (30) Prioritet: 1984-05-16 FR 8407589
- (73) Patenthaver: **SANOFI-SYNTHELABO**, 174 Avenue de France, F-75013 Paris, Frankrig
 (72) Opfinder: **Maurice Petitou**, 27, Rue du Javelot, 75645 Paris, Cedex 13, Frankrig
Jean-Claude Lormeau, 1, Rue Joseph Delattre, 76150 Maromme, Frankrig
Jean Choay, 130, Fg. St. Honoré, 75008 Paris, Frankrig
Jean-Claude Jacquinet, 1, Allée André Gide, 45100 Orleans La Source, Frankrig
Pierre Sinay, 5, rue Jacques Monod, 45100 Orleans La Source, Frankrig
- (74) Fuldmægtig: **Hofman-Bang Zacco A/S**, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark

(54) Benævnelse: **Biologisk aktive tetrasaccharider**

(57) Sammendrag:

Biologisk virksomme oligosaccharider indeholdende eller bestående af et tetrasaccharidisk kædesegment med strukturen DEFG med formlen:



hvor R_1 betegner en uorganisk anion, R_2 er identisk med R_1 eller betegner et hydrogenatom, og N_1 og N_2 betegner en funktionel aminogruppe, især på saltform med en organisk anion eller substitueret med acyl eller salte deraf, fremstilles ved en sekventiel reaktion mellem et passende halogenid af disaccharidet med strukturen EF og indeholdende en beskyttet OH-gruppe og en alkohol med strukturen 6, hvorpå, efter afblokering af OH-gruppen, denne reageres med et passende halogenid med strukturen D og eventuel videreudbygning af oligosaccharidet.

Forbindelserne indvirker på fribrinolyse, udviser en stærk anti-Xa-aktivitet og anvendes som anti-thrombotiske midler til forebyggelse eller kurativ behandling af sygdomstilstande hos dyr og mennesker.

Biologisk aktive tetrasaccharider

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte biologisk virksomme tetrasaccharider.

5

Den foreliggende opfindelse er en videreudvikling af den opfindelse, som er genstand for dansk patentansøgning nr. 143/83, der blev offentliggjort 16. juli 1983. I denne patentansøgning er beskrevet en fremgangsmåde til fremstilling af oligosaccharider bestående af eller indeholdende fragmenter af kæder af naturlige mucopolysaccharider på syreform samt derivater af disse oligosaccharider. Det skal bemærkes, at udtrykket "mucopolysaccharider på syreform" betegner sådanne derivater, der ligeledes hyppigt betegnes som glucosaminoglycuronglycaner. Disse derivater dannes af oligosaccharider og polysaccharider, som især udgør kæderne tilhørende biologisk aktive derivater, såsom derivater af heparintypen og af heparansulfattypen. Disse kæder udgøres hovedsageligt af alternerende komponenter: aminosukkerarturonsyre eller omvendt. I disse komponenter udviser aminosukkerarten især en D-glucoseaminstruktur (benævnt a), og uronsyregruppen en D-glucuronsyre-struktur (benævnt b) eller L-iduronsyre-struktur (benævnt c).

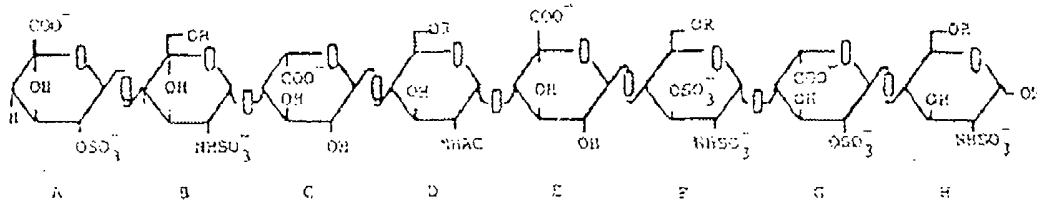
20

Den store smidighed, som er betegnende for den i ovennævnte danske patentansøgning beskrevne fremgangsmåde, gør det muligt at fremstille kædedannelser af de ønskede gentagelsesgrupper eller komponenter i overensstemmelse med den ønskede stereokemiske konfiguration og med fastlagte substitutioner. Det er således især muligt at opnå sådanne oligosaccharider, som udgør analoge forbindelser til strukturen af fragmenter fra heparinkæder.

25

Disse fragmenter kan med fordel indbefatte den octasaccharidiske kædestruktur ABCDEFGH, som hidtil er blevet opnået af ansøgeren ved enzymatisk depolymerisation af heparin, som beskrevet i US patentskrift nr. 4 401 662, og som har strukturformlen

30



Ved depolymerisering af heparin opnås i første omfang fragmenter af forskel-

5 lig længde og med forskellige sammensætninger. Ved kromatografisk frakti-

onering kan derefter opnås fraktioner, som overvejende indeholder forbind-

delser, der i struktur minder om hinanden.

I US patentskrift nr. 4 401 662 omtales det at antithrombin-aktiviteten og anti-

10 Xa-aktiviteten (målt ved den såkaldte Yin Wessier titer) blev målt for visse af

disse fraktioner. Ved sammenligning af måleresultaterne konkluderede man,

at fraktionerne formodentlig skulle indeholde forbindelser, der omfattede sek-

kvensen CDEF, hvis fraktionen skulle have en affinitet til antithrombin (ATIII),

idet man dog konstaterede tilstedeværelsen af sekvenserne ABCDEF og

15 CDEFGH i fraktionen. Yderligere konstaterede man at fraktioner indeholden-

de sekvensen DEFGH havde en høj anti-Xa-aktivitet, men fraktioner af

EFGH havde en lav aktivitet.

De syntetisk fremstillede oligosaccharider kan ligeledes omfatte kun en del af

20 denne kædestruktur ABCDEFGH, eller de kan bestå af denne kædestruktur.

De i formlen anførte bogstaver A - H betegner, således som de er anvendt i

den foreliggende beskrivelse, en strukturtype, idet substituenterne kan være

identiske eller forskellige fra de i formlen viste.

25

De syntetisk fremstillede oligosaccharider udgør, således som det er beskrevet

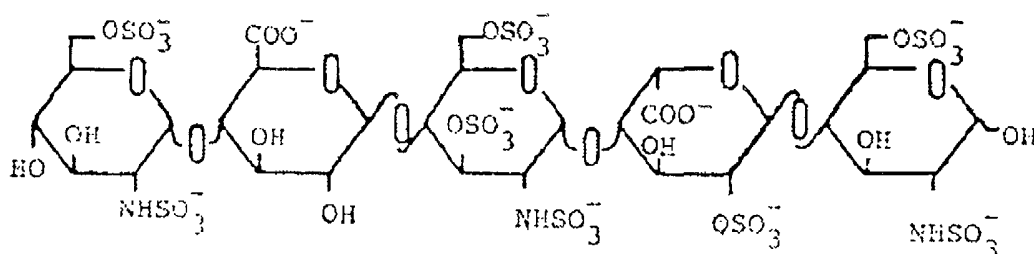
25 i nævnte patentansøgning, særdeles interessante biologisk reaktionsdyg-

tige substanser samt substanser anvendelige som referenceforbindelser. De er derudover i besiddelse af farmakologiske egenskaber, som bibringer dem en anvendelighed af stor vigtighed som aktive bestanddele i lægemidler.

- 5 Visse af disse syntetisk fremstillede oligosaccharider har ligeledes vist sig at være ganske særligt aktive i forbindelse med blodets koagulering.

Dersom man nemlig hos et trisaccharid med strukturen DEF har kunne konstatere en anti-Xa-aktivitet (målt ved den såkaldte Yin-Wessler-titer), er det med et pentasaccharid af strukturen DEFGH muligt at påvise en meget kraftig affinitet til antithrombin III (ATIII) og en anti-Xaaktivitet (Yin-Wessler), som er meget høj, idet den udgør mindst 2.000 Yin-Wessler-enhecler/mg.

15 Det testede produkt har formlen og er kendt fra DK patentansøgning nr. 143/83



20 Man har kunnet påvise en anti-Xa-aktivitet på mindst 2.000 Yin-Wessler-enheder/mg.

25 Man har nu under fortsættelse af de ovenfor omtalte forskningsarbejder overraskende konstateret en tilstrækkelig høj aktivitet hos en vis gruppe af lavere oligosaccharider (idet dette udtryk "lavere" skal være forstået i relation til pentasacchariderne) til at muliggøre en udnyttelse som aktiv bestanddel i antithrombotiske lægemidler.

Videreførelsen af disse forskningsarbejder har ført til fremstillingen af en specifik gruppe af oligosaccharider, som har vist sig på fordelagtig måde at have et bredt terapeutisk spektrum.

- 5 Den foreliggende opfindelse har således til formål at tilvejebringe en hidtil ukendt gruppe af tetrasaccharider, hvis struktur svarer til strukturen i fragmenter af kæderne i mucopolysaccharider.

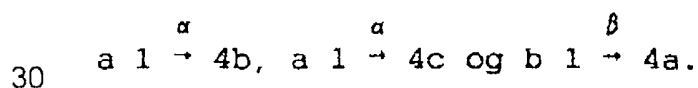
Disse tetrasaccharider kan anvendes som reaktionsdygtige substanser inden
10 for laboratoriet og som aktive bestanddele i lægemidler.

Tetrasacchariderne ifølge opfindelsen, der er af den i krav 1's indledning angivne art er ejendommelige ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne.
15

De undersøgelser, som er blevet gennemført af opfinderne inden for dette område, har påvist vigtigheden af sekvensen DEFG, som svarer til den blok, der betegnes som irregulær, og som er til stede i det naturlige heparin-molekyle. På baggrund af tidligere kendt teknik er det særdeles overraskende at
20 denne sekvens bibringer selve tetrasaccharidet DEFG farmakologiske egenskaber, der lader sig udnytte inden for et meget bredt terapeutisk område.

De definerede tetrasaccharider indeholder således to gentagelsesenheder D-glucosamin-D-glucuronsyre (a-b) og D-glucosamin-L-iduronsyre (a-c).
25

De komponenter, der er nævnt ovenfor som indgående i forbindelserne, er indbyrdes forbundet med hverandre af bindinger af typen 1-4, og de indbefatter følgende bindinger:



Tetrasacchariderne med strukturen DEFG har på overraskende måde i sig selv vist sig at have farmakologiske egenskaber, som er tilstrækkeligt kraftige til at muliggøre en anvendelse af disse produkter som aktiv bestanddel i lægemidler.

5

Man kan måle den økonomiske interesse i disse produkter i forhold til de højere oligosaccharider i den udstrækning, hvori de kun til syntese deraf kræver anvendelsen af fire komponenter eller gentagelsesgrupper.

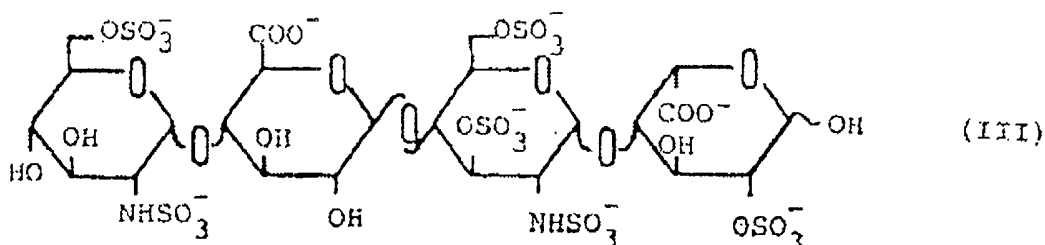
- 10 En familie, x, af tetrasaccharider, som er foretrukket på grund af deres høje anti-Xa-aktivitet og deres kraftige affinitet for ATIII, er forbindelser med den i krav 1 angivne almene formel II a, i hvilken R_2 betegner en uorganisk anion.

- 15 Tetrasaccharider af denne familie, hvori R_2 betegner en sulfat-anion, er ganske særlig foretrukne på grund af deres analogi med de naturlige produkter.

De særligt interessante tetrasaccharider i denne henseende indeholder ligeledes sulfatgrupper for i det mindste visse af de andre substitutioner, eller i særdeleshed for alle substitutionerne R_1 og/eller N_1 og N_2 .

20

Et foretrukket tetrasaccharid af denne type svarer til produkt nr. 12 i efterfølgende eksempel 3 med formelen:



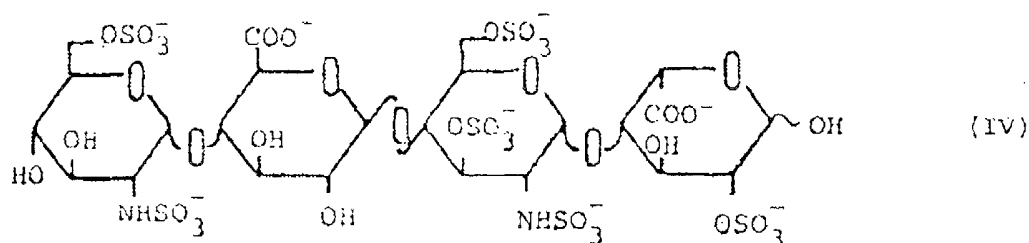
25

Andre uorganiske anioner kan, såsom phosphatgruppen, være til stede i stedet for sulfatgrupperne.

En anden familie y af tetrasacchariderne, som er foretrukket, især på grund af sin fibrinolytiske aktivitet, indeholder en substituent R_2 , som betegner et hydrogenatom.

5

Tetrasaccharider af denne type indeholder med fordel sulfatgrupper for mindst visse af de andre substitutioner R_1 og/eller N_1 og N_2 . Et tetrasaccharid af denne gruppe svarer til formelen:



10

Ligesom det er tilfældet i familien x, indeholder produkterne med fordel i stedet for en eller flere sulfatgrupper eller i stedet for det samlede antal af disse grupper andre uorganiske anioner, såsom phosphatanioner.

15

I de forskellige typer af tetrasaccharider, som er fremhævet i ovenstående, foreligger de forskellige uorganiske anioner og carboxylsyregrupper med fordel i form af salte med en uorganisk kation, især en metalkation, ganske særlig en alkalisk kation, såsom natrium, magnesium eller calcium, eller en kation af ledt af en nitrogenholdig organisk base, såsom triethylammonium.

20

Man kan med fordel fremstille tetrasacchariderne ifølge opfindelsen ved hjælp af den i det følgende beskrevne syntesefremgangsmåde.

25 Man omsætter i overensstemmelse med den mest almene definition på denne fremgangsmåde to forbindelser bestående af eller henholdsvis afsluttet

med komponenter med D-glucosamin-struktur, og med D-glucuronsyrestruktur eller L-iduronsyrestruktur.

5 Den ene af komponenterne aminosukkerart eller uronsyre består af en alkohol, hvori OH-gruppen i alkoholfunktionen indtager stillingen 4. Den anden komponent besidder så et aktiveret, anomert carbonatom, dvs. indbefattende en reaktionsdygtig gruppe, som er i stand til med OH-gruppen i alkoholen at etablere den ønskede -O-glycosyleringsbinding, i overensstemmelse med den ønskede stereokemiske konfiguration til dannelse af en sekvens aminosukkerart-uronsyre eller omvendt.
10

De grupper, der befinder sig på de komponenter, som tages i brug for at danne tetrasaccharidske kæde, bør især svare til følgende krav:

15 den reaktionsdygtige gruppe i aminosukkerartkomponenten eller uronsyrekomponenten bør være forligelig med de beskyttelsesgrupper og/eller funktionsdygtige grupper, der befinder sig på komponenterne;

beskyttelsesgrupperne for OH-grupperne og eventuelt aminogrupperne eller carboxylsyregrupperne bør være forligelige indbyrdes og med de grupper, som er udgangsforbindelser for aminogrupperne eller carboxylsyregrupperne, når disse er til stede;
20

beskyttelsesgrupperne og udgangsforbindelserne bør være inerte over for glycosyleringsreaktionen og i forhold til de reaktionsdygtige grupper, hvilket gør det muligt at placere under de senere behandlinger de givne substituentter på de forskellige placeringer og om ønsket på sekventiel måde.
25

Glycosyleringsreaktionen gennemføres på en sådan måde, at den ikke ændrer strukturen af komponenterne i disse produkter eller arten af de forskellige tilstedeværende substituentter.
30

Det ovenfor beskrevne glycosyleringstrin gentages på en sådan måde, at man opnår den ønskede længde af kæden.

- 5 For at kunne gennemføre denne forlængelse af glucidinskelettet gør man derpå brug af aminosukkerartkomponenter eller uronsyrekomponenter, som indbefatter midlertidige beskyttelsesgrupper, dvs. grupper, som er i stand til selektivt at blokere en stilling i aminosukkerartkomponenten eller uronsyrekomponenten, som er bestemt til at indgå i en ny glycosyleringsreaktion. Det drejer sig om grupper, der lader sig fjerne i nærvær af andre grupper, der foreligger på komponenterne, under gendannelse af en alkohol.
- 10

- Efter tildannelsen af det ønskede glucidinskelet underkaster man den således dannede kæde en eller flere kemiske reaktioner med det formål at indføre en given type funktionelle grupper eller successivt flere typer af grupper, hvorpå man danner, hvis dette er ønsket, derivater af disse funktionelle grupper.
- 15

- For at indføre specifikke substituentter, dvs. bestemte substituentter i fastlagte stillinger, anvender man med fordel udgangsforbindelser indeholdende flere typer af beskyttelsesgrupper, nemlig (1) en eller flere semi-permanente grupper og (2) en eller flere permanente grupper.
- 20

- De semi-permanente grupper lader sig fjerne i første omgang og gør det muligt at indføre de ønskede funktionelle grupper i de stillinger, som de har indtaget. De permanente grupper er derimod i stand til at opretholde beskyttelsen af OH-grupperne under indføringen af funktionelle grupper i placeringerne for de semi-permanente grupper.
- 25

- Udgangsforbindelserne af aminosukkerart-typen indeholder derudover i 2-stillingen en nitrogenholdig gruppe, som gør det muligt at opretholde tilstedeværelsen af
- 30

værelsen af en nitrogenholdig funktionsdygtig gruppe under iværksættelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Denne nitrogenholdige gruppe består fortrinsvis af grupper, såsom N_3 eller $-NHCOO-CH_2-C_6H_5$ eller en hvilken som helst anden gruppe, som udgør en precursor for aminogruppen eller for et aminogruppederivat, især $-NHSO_3$ eller $-NH-acyl$, især $-NH-COCH_3$.

Med hensyn til carboxylsyregrupperne i uronsyrekomponenten er disse blokeret med grupper, som er inerte over for de reaktioner, der tages i brug, ved udskiftningen af beskyttelsesgrupperne og lader sig fjerne ved syntesens afslutning til frigivelse af carboxylsyregrupperne, eventuelt ved afslutningen af saltdannelsen. Disse beskyttelsesgrupper for carboxylsyregruppen vælges med fordel blandt alkylgrupper eller arylgrupper.

Disse behandlinger anvendes for at fremstille oligosacchariderne ifølge opfindelsen.

Ved en foretrukken fremgangsmåde til opnåelsen af sekvensen DEFG omsætter man med fordel et halogenid, mere specielt bromidet, af et saccharid med strukturen EF, hvis syntese er beskrevet i den tidligere omtalte patentansøgning med en alkohol med en gentagelsesgruppe af strukturen G.

Disaccharidet EF indbefatter en midlertidig gruppe i 4-stillingen af komponenten E. Denne gruppe vælges med fordel blandt acylgrupper, især acetyl- eller chloracetylgruppen.

Kondensationsreaktionen gennemføres i et opløsningsmiddelmedium, især et organisk opløsningsmiddel særligt af typen dichlormethan eller dichlorethan.

Man anvender med fordel en katalysator, i almindelighed et sølvsalt eller et kviksølv salt, fx sølvtrifluormethansulfonat, som i almindelighed betegnes som

sølvtriflat, sølvcarbonat, sølvoxid, mercuribromid eller mercuricyanid. Man anvender ligeledes en protonacceptor, såsom symcollidin såvel som et middel til opfangelse af det vand, som eventuelt er til stede og/eller opfangelse af den dannede hydrogenhalogenidsyre, fx en molekylærsigte 4Å.

5

En undersøgelse af reaktionsbetingelserne viser, at det er passende at arbejde ved omgivelsernes temperatur eller ved en lavere temperatur, som kan nå ned på 0°C eller endnu lavere, under en atmosfære af en inert gas, såsom nitrogen eller argon.

10

Efter dannelsen af den trisaccharidiske kæde med strukturen EFG fjernes den temporære gruppe på komponenten E i overensstemmelse med klassiske fremgangsmåder til genskabelse af -OH-gruppen. Denne sidstnævnte involveres så i en glycosyleringsreaktion med halogenidet, især med bromidet, af komponenten med strukturen D.

15

For mere specielt at fremstille tetrasaccharider med formlen (II a), hvori R_1 betegner en sulfatgruppe, R_2 et hydrogenatom og N_1 , og N_2 er identiske og repræsenterer sulfoaminogruyper, anvender man udgangsmaterialer indeholdende følgende grupper.

20

Beskyttelsesgrupperne for -OH-grupperne i disse forskellige komponenter beregnet til at blive sulfateret er beskyttet med acylgrupper, især acetylgrupper, medens OH-grupperne, der er beregnet til at blive frigivet ved syntesens afslutning, er beskyttet med en permanent gruppe, såsom benzylgruppen.

25

2-stillingerne i aminosukkerart-komponenterne substitueres med grupper, såsom N_3 eller $NH-COO-CH_2-C_6H_5$, og 6-stillingerne i uronsyrekomponenterne indtages af carboxylsyregrupper, som er beskyttet med en alkylgruppe, især med en methylgruppe.

30

Trinnet til funktionalisering af den dannede tetrasaccharidiske kæde, dvs. til sekventiel indførelse af specifikke substitutioner, gennemføres nu analogt med fremgangsmåden beskrevet i den tidligere nævnte danske patentansøgning 143/83.

Disse reaktionsbetingelser gør det muligt at gennemføre funktionaliseringstrinnet, for eksempel på følgende måde:

10 Man indfører først og fremmest selektivt sulfatgrupperne efter at have fjernet -O-acetylgrupperne, som er anvendt til blokeringen. Denne reaktion gennemføres på en sådan måde, at man ikke influerer på de tilstedeværende benzylgrupper og nitrogenholdige grupper og carboxylsyregrupper.

15 Med henblik herpå gennemfører man med fordel en forsæbningsreaktion ved hjælp af en stærk base, såsom natriumhydroxid.

Denne reaktion gennemføres fortrinsvis ved en temperatur lavere end omgivelsernes temperatur, mere specielt i nærheden af 0° C.

20

Man underkaster det derved opnåede reaktionsprodukt hydrolyse ved indvirkning af et alkyleringsmiddel for at indføre på carboxylsyregrupperne de beskyttende alkylgrupper, som er blevet fjernet under hydrolysen.

25 Ved reaktion med et sulfateringsmiddel opnår man først indføringen af sulfatgrupperne i de ved hydrolysen frigivne stillinger, som er blevet efterladt frie efter indvirkningen af alkyleringsmidlet.

30 De til gennemførelsen af sulfateringen tilfredsstillende reaktionsbetingelser indbefatter anvendelsen af et sulfateringsmiddel, såsom et kompleks af trimethylamin/SO₃⁻.

Denne reaktion gennemføres med fordel i et opløsningsmiddel, såsom dimethylformamid. Man arbejder fortrinsvis ved en temperatur højere end omgivelsernes temperatur, i almindelighed ved 50°C, hvilket svarer til en reaktions-

5 onstid på ca. 12 timer.

Efter indføringen af sulfatgrupperne på alkohol-komponenten fortsætter man frigivelsen af OH-grupperne, som er blokeret med benzylgrupper.

10 Fjernelsen af benzylgrupperne gennemføres med fordel ved katalyseret hydrogenering under betingelser, som er forligelige med opretholdelsen af sulfatgrupperne og med omdannelsen af de nitrogenholdige grupper til funktionelle aminogru-

15 Man arbejder fortrinsvis under et hydrogentryk og i nærvær af en katalysator af typen Pd/C.

Denne reaktion gennemføres med fordel i et organisk opløsningsmiddelmedium, især i et alkoholisk medium tilsat vand.

20

For at opnå hydrogeneringen af de nitrogenholdige grupper, der optræder som precursorer, og fjernelsen af de grupper, som er beskyttelsesgrupper for -OH-grupperne, gennemføres reaktionen med fordel med en varighed på ca. 3 - 4 dage.

25

De funktionelle aminogru-
pper foreligger, som det allerede er anført, i form af derivater af typen N-acetyl eller N-sulfat i de i betragtning kommende biologisk aktive molekyler.

For at danne N-acetyl-grupper underkaster man reaktionsproduktet kommende fra hydrogeneringsreaktionen indvirkning af et acetyleringsmiddel. I den forbindelse udgør eddikesyreanhydrid især et særligt egnet middel.

- 5 For at gennemføre den selektive acetyleringsreaktion uden at indvirke på de andre substituenten, som foreligger på komponenterne, er det især ønskeligt at arbejde ved basisk pH, især i nærheden af værdien 8 i vandigt medium.

- 10 Man kan ligeledes ønske at danne N-sulfat-grupper, hvilket kan gennemføres ved hjælp af et sulfateringsmiddel af den ovenfor angivne type. pH-værdier større end 9, med fordel i størrelsesordenen 9-10, anvendes til sulfateringen.

Efter sulfateringsreaktionen gør tilsætningen af en stærk base det muligt at frigive carboxylsyregrupperne.

- 15 De således dannede reaktionsprodukter kan let omdannes til salte ved hjælp af passende kationbytterharpikser. I de naturlige produkter udgøres kationen især af natron. Man anvender således med fordel natiurnkationbytterharpikser.

- 20 Man kan ligeledes danne salte af kalium, lithium, magnesium eller calcium. Man anvender så en protonbytterharpiks, hvorpå man neutraliserer den således dannede syre med den pågældende kations base.

- 25 Undersøgelsen af de farmakologiske virkninger af tetrasacchariderne ifølge opfindelsen har gjort det muligt at påvise deres interesse inden for terapien.

De udøver især en aktivitet på fibrinolysen, idet de forøger indholdet af cirkulerende aktivator for plasminogen og sensibiliserer blodkoagel over for lyse.

- 30

Man har gennemført undersøgelser på forskellige eksperimentelle modeller i overensstemmelse med den teknik, som er beskrevet af Vairel et al. i *Ann. Pharmaceutiques françaises*, 1983, 41, nr. 4, side 339—353.

- 5 Man iagttager således 15 minutter efter injektion ad intravenøs vej på kaniner (anæstesi 20 minutter før indgift) af 0,25 mg oligosaccharider pr. kg en forøgelse af indholdet af aktivator for plasminogen i det cirkulerende blod.

10 Med for eksempel tetrasaccharidet DEFG med formlen (III) iagttager man en gennemsnitlig forøgelse af områderne for lyse på 17,80, medens man med fysiologisk saltvandsopløsning, der anvendes som kontrolsubstans, bemærker en formindskelse på 0,5.

15 Undersøgelser gennemført med tetrasaccharider ifølge opfindelsen, i hvilke komponenten med strukturen F indeholder en $-SO_3$ -gruppe i 3-stillingen, har vist en anti-Xa-aktivitet, som klart er større end aktiviteten af heparin, og en kraftig affinitet over for AT—III. I tilfælde for eksempel af tetrasaccharidet med formlen (III) (produkt nr. 11) er anti-Xa-aktiviteten målt med et homogent substrat 600 enheder anti-Xa/mg (metodik efter Teien A.M. og Lie modifice-
20 ring, *Thrombosis Research* nr. 10,937,388—410)

Den terapeutiske effektivitet af de pågældende produkter er blevet undersøgt med veldefinerede dyremodeller for at fastlægge deres anti-thrombose-evner under kendte patologiske betingelser.

25

Man opnåede følgende resultater med modellen for modificeret stasis hos kaniner (se *Thromb. og Hemost.* 46, (1) 117, 1981 af Andersen et al.).

30 Man indgav i kaniner intravenøst 50 μ g/kg af produktet opløst i en saltopløsning (i en mængde på 100 μ g/kg) 5 minutter før tilførsel af et thrombogent middel. Det thrombogene middel bestod enten af kaninserum eller af midlet

PCC/RVV (koncentrat af et kompleks af prothrombin og hugormegift (Rupper)). Staserne i venstre og højre halsvener blev gradbedømt på en skala fra 0 til 10.

- 5 Man iagttager en fuldstændig beskyttelse (bedømmelsen 0) over for virkningerne af thrombogener indført med kaninserum og en delvis beskyttelse over for det thrombogene middel PCC/RVV (bedømmelsen 5), idet kontroldyrene viste en bedømmelse på 10.
- 10 Tetrasacchariderne ifølge opfindelsen, i hvilke komponenten med strukturen F indeholder i 3-stillingen en OH-gruppe, synes ikke at besidde aktivitet over for Xa-faktoren, og de udviser således en meget større specificitet end den gruppe oligosaccharider, som har en SO₃-gruppe i 3-stillingen i komponenten med strukturen F, over for den fibrinolytiske aktivitet.
- 15 De toksikologiske undersøgelser af produkterne ifølge opfindelsen har vist deres uskadelighed, hvilket gør dem værdifulde ved fremstillingen af lægemidler.
- 20 Tetrasacchariderne ifølge opfindelsen kan anvendes i farmaceutiske formuleringer og især farmaceutiske præparater, som er fri for pyrogene substanser, og som indeholder en effektiv mængde af de aktive bestanddele i kombination med farmaceutiske ekscipients.
- 25 Tetrasacchariderne ifølge opfindelsen er især anvendelige i sådanne præparater, i hvilke den farmaceutisk bærer er egnet til peroral indgift. Indgivningsformer, som er egnede til peroral indgift, kan med fordel være gastroresistente gelatinekapsler, sammenpressede pulvere eller tabletter, piller, eller forbindelserne kan foreligge i form af liposomer.

Andre farmaceutiske præparater indeholder disse tetrasaccharider i kombination med ekscipiens, som er egnet til indgift gennem rectum. Tilsvarende indgiftsformuleringer består af suppositorier.

- 5 Andre indgivningsformer består af aerosoler eller pomader.

Tetrasacchariderne ifølge opfindelsen kan ligeledes anvendes i farmaceutiske præparater til injektionsbrug, som er sterile, eller som kan steriliseres, til indgift, enten intravenøst eller intramuskulært eller subkutant. Disse opløsninger indeholder med fordel produkter af familien x i en mængde på 1.000 - 100.000 enheder μ (Yin-Wessler)/ml oligosaccharider, fortrinsvis 5.000-50.000, f.eks. 25.000 μ /ml, når disse opløsninger er beregnet til indsprøjtning subkutant. De kan f.eks. indeholde 500-10.000, især 5.000 μ /ml oligosaccharider, når de er beregnet til indsprøjtning intravenøst eller til perfundering.

15

Sådanne farmaceutiske præparater foreligger med fordel i form af engangsprøjter, som er klar til anvendelse.

Ligeledes kan farmaceutiske præparater indeholdende de omtalte tetrasaccharider i kombination med andre aktive bestanddele.

20

De farmaceutisk præparater indeholdende tetrasacchariderne ifølge opfindelsen er især egnet til regulering (forebyggende eller kuratit) af visse trin i blodets koagulering i mennesker eller dyr, især i det tilfælde, hvor patienten er underkastet risiko for hyperkoaguleringssevne, især som et resultat af kirurgiske indgreb, atheromatoseprocessen, udviklingen af tumorer, forstyrrelser af koagulationen gennem bakterieaktivatorer eller enzymatiske aktivatorer etc.

25

Til belysning af opfindelsen skal i det følgende angives et eksempel på dosologi, som er anvendelig hos mennesker, i forbindelse med produkterne tilhø-

30

rende familien x: Denne posologi omfatter f.eks. indgift til patienten af 1.000-25.000 enheder μ (Yin og Wessler) subkutant, en til tre gange om dagen, afhængigt af niveauet for risikoen for hyperkoaguleringssevne eller den thrombotiske tilstand hos patienten, eller fra 1.000 til 25.000 μ /24 timer ved intravenøs indgift, ved diskontinuert indgift med regelmæssige intervaller eller 5 kontinuert ved hjælp af perfusion, eller også 1.000-25.000 μ (tre gange om ugen) ved intramuskulær eller subkutan indsprøjtning (disse indhold er angivet i Yin-Wessler-enheder). Disse doseringer kan naturligvis reguleres for hver enkelt patient som funktion af resultaterne og af de forinden gennemførte blodanalyser, og af arten af de lidelser, som patienten lider af, og i al 10 almindelighed af patientens sundhedstilstand.

Når det drejer sig om produkter af familien y, indgiver man 1-100 mg/dag, afhængigt af patientens tilstand og af den anvendte farmaceutiske form.

15

Udover de farmaceutiske præparater indeholdende tetrasacchariderne, som de foreligger, kan farmaceutiske præparater ligeledes indeholde mindst ét oligosaccharid som ovenfor defineret, som er konjugeret med en kovalent binding til et opløseligt bærestof eller til et uopløseligt bærestof, med fordel 20 ved hjælp af en sukkerart med endestillet reducerende gruppe.

Foretrukne konjugater fikseret til opløselige bærestoffer består især af tetrasaccharider AT-III-konjugater indeholdende en sekvens DEFG med formlen (II a), især en sulfatgruppe. Sådanne produkter udgør særligt interessante 25 lægemidler til forebyggelse af thromboser, når det drejer sig om AT-III-mangeltilstande.

Andre foretrukne konjugater med opløselige bærestoffer udgøres af tetrasaccharider med den almene formel (II a), der er fikseret til et bærestof, såsom et protein, især polylysin eller bovint serumalbumin. 30

Disse produkter er anvendelige som immunogene substanser, der i sig selv er kilde til antistof-cirkulationsprodukter in vivo, eller som monoclonale antistoffer, som er klonede in vitro ved hjælp af en passende teknik.

- 5 De omhandlede tetrasaccharider er ved andre foretrukne konjugater bundet til uopløselige bærestoffer. Man vil her med fordel anvende de klassiske bærestoffer. Disse konjugater lader sig anvende som immunosorbenter, fx ved en højt specifik oprensning af AT-III samt ved bestemmelse heraf, eller til fremstilling af thrombotiske polymere, der er forligelige med blod, ved fikse-
- 10 ring af oligosacchariderne på biologisk forligelige polymere, når de indeholder en sekvens DEFG i overensstemmelse med den ovenfor beskrevne familie x.

- Tetrasacchariderne ifølge opfindelsen kan ligeledes anvendes inden for
- 15 nuclear-medicinen som radio—farmaceutiske produkter. Disse produkter markeres i så fald ved hjælp af en trecer, valgt blandt sådanne, som almindeligvis anvendes inden for dette område, især ved hjælp af technetium 99 m.

- 20 Med henblik herpå omdanner man technetium 99 m, som er opnået ud fra kommercielt tilgængelige generatorer i form af ikke-reaktionsdygtige natriumpertechetat med valensen 7 til technetium, som er reduceret i valens til 4, hvilket er den mest reaktionsdygtige form for technetium. Denne omdannelse gennemføres med et reducerende system, som dannes ud fra tinsalte (stano-
- 25 nochlorid), jernsalte (ferrosulfat), titansalte (titantrichlorid) eller andre salte.

I langt de fleste tilfælde er denne simple reduktion af technetium tilstrækkelig til, at man under de fastlagte pH-betingelser kan gennemføre fiksering af technetium på det pågældende molekyle.

Man kan anvende de omhandlede forbindelser, som på en vis måde udgør et bærestof, ved målinger i størrelsesordenen 100 - 200 enheder μ Yin—Wessler.

- 5 Ved videreudvikling af disse radio-farmaceutiske reaktionskomponenter kan man gå frem i overensstemmelse med den metode, som er angivet af P.V. Kulkarni et al. i *The Journal of Nuclear Medicine* 21, nr. 2, side 117—121.

- 10 Man anvender med fordel de således mærkede produkter ved afprøvninger in vivo til påvisningen af og diagnostiseringen af omfanget af thromboser og af thrombotiske til stande.

- 15 De omhandlede tetrasaccharider kan ligeledes anvendes til bestemmelsen af specificiteten i talrige enzymsystemer, som er involveret i glucosaminglucuronoglycanernes metabolisme.

- 20 De efterfølgende eksempler belyser andre fordelagtige karakteristika knyttet til forbindelserne ifølge opfindelsen og fremgangsmåden til fremstilling deraf. Der henvises til figurerne 1 - 5, som belyser de produkter, der anvendes ved de beskrevne synteser.

I disse figurer anvendes formlernes nummereringer på samme måde som i eksemplerne til beskrivelse af ensartede produkter.

- 25 I de pågældende formler anvendes følgende forkortelser:

Ac — acetyl

Me - methyl

Bn - benzyl

- 30 Lev - lævinyll

MCAO - monochloracetyl og

Z - benzyloxycarbonyl.

EKSEMPEL 1

- 5 Fremstilling af trisaccharid nr. 3 med strukturen EFG, dvs. benzyl-O-[methyl-2,3-di-O-benzyl-4-O-chloracetyl- β -D-glucopyranosyluronat-(1 \rightarrow 4)-O-(3,6-di-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-[methyl-2-O-acetyl-3-O-benzyl- α -L-idopyranosiduronat]
- 10 Man gennemfører syntesen af trisaccharid nr. 3 ved kondensation mellem et halogenid med strukturen EF og en alkohol med strukturen G. Disse reaktionskomponenter er nummereret henholdsvis 1 og 2 i beskrivelsen.

Dette kondensationstrin gennemføres som følger:

15

Man omrører ved 20 °C i nærvær af en pulverformig molekylarsigte 4 Å i pulverform en opløsning af 738 mg (0,92 mmol) af halogenidet 1 og 428 mg (1 mmol) af alkoholen 2 i 15 ml vandfrit dichlorethan. Derpå tilsættes 150 ml collidin og derpå 262 mg (10 mmol) sølvtriflat. Reaktionsblandingen fortyndes

20 efter 1 time ved -20°C med dichlormethan, hvorpå den filtreres. Den organiske fase vaskes med 10% KHSO₄ i vand, tørres (Na₂SO₄) og opkoncentreres derpå til tørhed. Det opnåede skum (1,07 g) kromatograferes over silicagel (toluen/ethylacetat; 4/1; v/v), hvilket fører til det rene trisaccharid 3 (699 mg; 63%) i form af et hvidt skum.

25

$[\alpha]_D^{+25}$: +25° (c 1,4; chloroform).

EKSEMPEL 2

- 30 Fremstilling af et tetrasaccharid nr. 6 med strukturen DEFG, dvs. benzyl-O-(6-O-acetyl-2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-des-oxy- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-

[methyl-2,3-di-O-benzyl- β -D-glucopyranosyluronat]-(1 \rightarrow 4)-O-(3,6-di-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(methyl-2-O-acetyl-3-O-benzyl- α -L-idopyranosiduronat).

- 5 Denne syntese gennemføres ved kondensation af et halogenid 5 med strukturen D og en alkohol 4 svarende til trisaccharidet 3, hvori OH-gruppen i 4-stillingen af komponenten E er blevet afblokeret.

Man beskriver altså successivt:

10

(a) opnåelse af trisaccharidet 4 ud fra trisaccharidet 3 fremstillet som beskrevet i eksempel 1,

(b) kondensationen af 4 med halogenidet 5.

15

Trin a:

669 mg (0,55 mmol) af trisaccharidet 3 fremstillet som beskrevet i eksempel 1 opløses i en blanding af 3,8 ml lutidin og 1,25 ml eddikesyre. Derpå til-
20 sættes methanol efterfulgt af en opløsning af hydrazindithiocarbonat opnået gennem den metode, som er beskrevet af Boeckel og Beetz i Tetrahedron letters 24 (1983) 3775-3778. Efter 2 timer ved omgivelsernes temperatur fortyndes opløsningen ved tilsætning af 200 ml dichlormethan, hvorpå den va-
skes (mættet NaHCO₃ og vand; 10% KHSO₄ i vand), tørres (Na₂SO₄) og op-
25 koncentrerer til tørhed. Det rene reaktionsprodukt (530 mg; 83%) opnås efter kromatografi over silicagel (toluen/ethylacetat; 2/1; v/v).

$[\alpha]_D$: -29° (c 1,29; chloroform).

30 Elementæranalyse for C₅₄H₁₁O₂₀N₃:

Beregnet: C 60,50 - H 5,74 N 3,92

Fundet : C 60,46 - H 5,74 - N 4,11.

Trin b:

5

Man behandler en opløsning af 494 mg (0,455 mmol) af alkoholen 4 i dichlormethan og af 1,096 g (2,2 mmol) af halogenidet 5 med 632 mg sølvtriflat i nærvær af 360 µl symcollidin, som det er beskrevet i forbindelse med syntesen af forbindelsen 3. Efter rensning over en søjle af silicagel (gradient chloroform → chloroform/ethylacetat; 20/1; v/v) opnår man det rene derivat 6 (575 mg; 89%).

10

$[\alpha]_D$: +43° (1,27; chloroform)

15 Elementæranalyse for $C_{76}H_{84}O_{24}N_6$:

Beregnet: C 61,61 - H 5,71 - N 5,67

Fundet : C 61,57 - H 5,76 - N 5,61.

20 EKSEMPEL 3

Fremstilling af tetrasaccharidet nr. 11 med strukturen

25 DEFG, dvs. 0-(2-desoxy-6-O-sulfo-2-sulfamido- α -D-gluco-pyranosyl)-(1→4)-0-(β -D-glucopyranosyluronat)-(1→4)-0-(2-desoxy-3,6-di-O-sulfo-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-2-O-sulfo- α -L-idopyranuronat, octanatriumsalt.

30 Man opnår dette tetrasaccharid ved sekventiel afblokering af OH-grupperne og indføring af de ønskede grupper på tetrasaccharidet 6 fremstillet som beskrevet i eksempel 2.

Følgende successive trin tages i brug:

- 1 - frigørelse af OH—grupperne, som er blokeret med acetylgrupper;
- 5 2 - dannelse af natriumsaltene af sulfatgrupperne;
- 3 - dannelse af natriumsaltene af carboxylsyregrupperne;
- 4 - Frigørelse af OH-grupperne, som er blokeret med benzylgrupper, og
10 omdannelse af azidogrupperne til aminogrupper;
- 5 - esterificering af aminogrupperne.

Disse trin gennemføres som følger:

15

- 1 - Overførsel af -OAc til -OH førende til tetrasaccharidet 7.

Man opløser 0,340 g af derivatet 6 fremstillet som beskrevet i eksempel 2 i en blanding af 30,6 ml methanol, 3,5 ml chloroform og 4,25 ml vand. Derpå
20 tilsættes 4,25 ml 5-N hydroxidopløsning. Efter 4 timer ved omgivelsernes temperatur tilsætter man 90 ml chloroform og derpå 8 ml 8N saltsyre. Efter dekantering frasepareres chloroformfasen. Den vandige fase vaskes med chloroform (3 x 10 ml). Chloroformfaserne samles og tørres (Na_2SO_4). Den efter opkoncentration til tørhed opnåede inddampningsrest methyleres med
25 diazomethan, hvorpå den kromatograferes over en silicagelsøjle, idet man eluerer med en gradient (dichlormethan \rightarrow dichlormethan/ ethylacetat; 1/1; v/v). Man opnår forbindelsen 7 (0,173 g; 57%).

$[\alpha]_D$: 14° (c 1; chloroform).

30

Elementæranalyse for $\text{C}_{68}\text{H}_{76}\text{O}_{21}\text{N}_6$, 0,5 H_2O

Beregnet: C 61,68 - H 5,93 - N 6,34

Fundet : C 61,62 - H 5,84 - N 6,31.

5 2 - Overførsel af -OH til -O-SO₃Na førende til tetrasaccharidet nr. 8

Man opløser 117 mg (0,068 mmol) af forbindelsen 7 i 3 ml vandfrit dimethylformamid, hvorpå dette sulfateres natten over ved 50°C i nærvær af 123 mg trimethylamin/ SO₃. Reaktionsblandingen fortyndes derpå ved tilsætning af en
10 blanding af methanol/chloroform (1/1; v/v; 3 ml), hvorpå der kromatograferes over en kolonne af "Sephadex LH 20", som er bragt i ligevægt i chloroform/methanol (-1/1; v/v). Det således opnåede reaktionsprodukt anvendes direkte til fremstillingen af 9.

15 3 - Overførsel af COOMe til COONa førende til tetrasaccharidet nr. 9

Man opløser 357 mg (0,207 mmol) af forbindelsen 8 i en blanding af 8 ml methanol og 2 ml vand, hvorpå man tilsætter 1,2 ml 5N natriumhydroxid. Efter 3 timers omsætning lader man reaktionsblandingen passere gennem en
20 kolonne af harpiksen "Dowex 50 - H⁺" som er bragt i ligevægt med en blanding af ethanol/vand (8/2; v/v). Eluatet bringes til at passere gennem en søjle af "Dowex 50 - Na⁺", som er bragt i ligevægt med det samme opløsningsmiddel. Efter inddampning til tørhed opnår man reaktionsproduktet 9 i ren tilstand (0,267 g) efter en kromatografering over en silicagelsøjle (30 g;
25 ethylacetat/ pyridin/eddikesyre/vand; 160/77/19/42; v/v/v/v), efterfulgt af en passage over en ionbytter "Sephadex SPC 25" (18 g), som er bragt i ligevægt med Na⁺-formen i en blanding methanol/vand (8/2; v/v).

$[\alpha]_D$: 5,50 (1,025; methanol).

4 - Overførsel af OBn til -OH og af -N₃ til -NH₂ førende til tetrasaccharidet nr. 10

Man opløser 256 mg (0,147 mmol) af forbindelsen 9 i en blanding methanol/vand (9/1; v/v; 10 ml), hvorpå man hydrogenere i nærvær af en katalysator (Pd/C 10%; 130 mg) i 5 dage. Katalysatoren erstattes med frisk katalysator, hvorpå reaktionen fortsættes i 4 dage. Produktets UV-spektrum viser så fraværet af benzylerede derivater. Det opnåede produkt (0,17 g) overføres direkte til præparationen af forbindelsen nr. 11

10

5 - Overførsel af -NH₂ til -NHSO₃Na førende til tetrasaccharidet nr. 11

Man sætter lidt efter lidt til en opløsning af 9,17 g (0,152 mmol) af forbindelsen 10 i 10 ml vand 140 mg (0,75 mmol) af komplekset pyridin/SO₃, idet man opretholder pH ved 9,5 ved tilsætning af 2M-natriumhydroxid. En fornyet tilsætning af det sulfaterende kompleks foretages efter 1 times forløb (70 mg) og efter en nats forløb (70 mg). Reaktionsblandingen anbringes derpå på toppen af en kolonne af "Sephadex G 50" (300 x 2,5 cm), som er elueret med 0,2M natriumchlorid. Reaktionsproduktet absorberes derpå på toppen af en kolonne af harpiksen "Biore AG 1 x 2" (1,6 x 10 cm) på Na⁺-formen elueret med en gradient af natriumchlorid (0,5M - 3M). De fraktioner, som indeholder reaktionsproduktet, samles.

15

20

Saltene fjernes ved kromatografi over "Sephadex G-25" (100 mg). Til sidst lyofiliseres reaktionsproduktet (111 mg; 54%).

25

$[\alpha]_D$: + 46 (c 0,85; vand).

Man opnår, idet man tager i brug i de ovenfor beskrevne behandlingstrin en komponent G indeholdende en -OCH₃ i stedet for en -OBn-gruppe ved det anomere carbonatom, tetrasaccharidet nr. 12.

30

I den efterfølgende tabel er anført betydningerne af substituenterne A_1 - A_5 med formelen 5, som er vist på fig. 1 for forbindelserne 6 - 12.

	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5
6	Ac	Bn	N_3	Me	Bn
7	H	Bn	N_3	Me	Bn
8	SO_3Na	Bn	N_3	- Me	Bn
9	SO_3Na	Bn	N_3	Na^+	Bn
10	SO_3Na	H	NH_2	Na^+	H
11	SO_3Na	H	$NHSO_3Na$	Na^+	H
12	SO_3Na	H	$NHSO_3Na$	Na^+	CH_3

5

NMR 1H for tetrasaccharidet ifølge opfindelsen er vist på fig. 5 i den nederste del. I den øverste del er til sammenligning anført NMR-spektre af det tilsvarende pentasaccharid indeholdende en OSO_3 -gruppe i 3-stillingen i komponenten F. Man tilskriver signalet ved 5,51 ppm, som er iagttaget ved DEFGH indeholdende OSO_3^{-3} -gruppen, komponenten F i 3-stillingen ved den anomere proton i gentagelsesgruppen glucosamin-3-O-sulfat. Dette signal er forskudt til ca. 5,45 ppm ved den tilsvarende komponent F i ikke-sulfateret tilstand, og den overlejrer det tilsvarende signal fra komponenten H.

15

NMR-spektralanalysekarakteristika for det til sammenligning anvendte penta-saccharid DEFGH er som følger:

¹H-NMR: i D₂O i forhold til TSP intern:

Komponent D: 5,64 (H-1)
3,30 (H-2)
3,63 (H-3)
3,57 (H-4)
3,90 (H-5)
4-4,5 (H-6,6) .

Komponent E: 4,62 (H-1)
3,40 (H-2)
3,87 (H-3) .

Komponent F: 5,45 (H-1)
3,25-3,30 (H-2) .

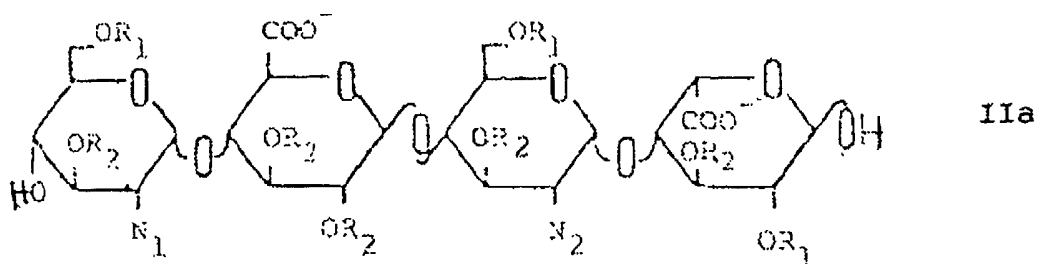
Komponent G: 5,24 (H-1)
4,33 (H-2)
4,20 (H-3)
4,11 (H-4)
4,81 (H-5) .

Komponent H: 5,44 (H-1 α)
4,70 (H-1 β)
3,25 (H-2 α)
3,05 (H-2 β)
3,69 (H-3)
3,79 (H-4) .

Patentkrav:

1. Tetrasaccharider, kendt og betegnet ved, at de har strukturen DEFG med den almene formel

5



hvor i grupperne R_1 , som er ens eller forskellige, betegner en uorganisk anion, især en sulfatgruppe eller en fosfatgruppe,

10

R_2 har en af de for R_1 anførte betydninger, eller betegner et hydrogenatom,

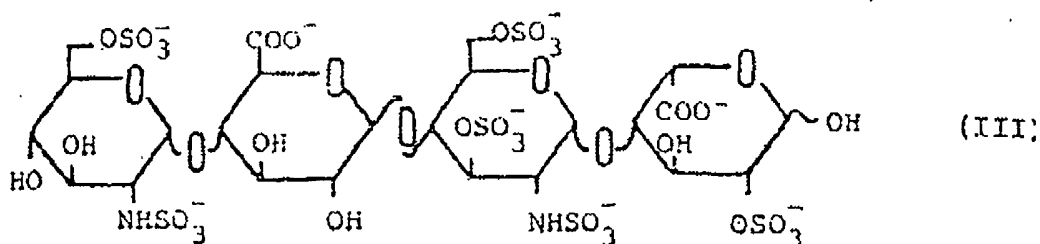
N_1 og N_2 , som er ens eller forskellige, betegner $-NH_2$, en sulfoaminogruppe, en phosphoaminogruppe eller $-NH-COR_3$, hvori R_3 betegner en alkylgruppe,

15

og salte deraf, fortrinsvis sådanne, for hvilke substituenten R_2 i 3-stillingen i komponenten F betegner en uorganisk anion, især en sulfatgruppe, og for hvilke en, flere eller alle substitutionerne R_2 , N_1 og/eller N_2 indbefatter en sulfatgruppe.

20

2. Tetrasaccharid ifølge krav 1 med formlen:



3. Tetrasaccharider ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at substituenten R_2 i 3-stillingen i komponenten (F) betegner et hydrogenatom, og at i det mindste visse af de andre substitutioner R_1 , N_1 og/eller N_2 indbefatter en sulfat-gruppe.

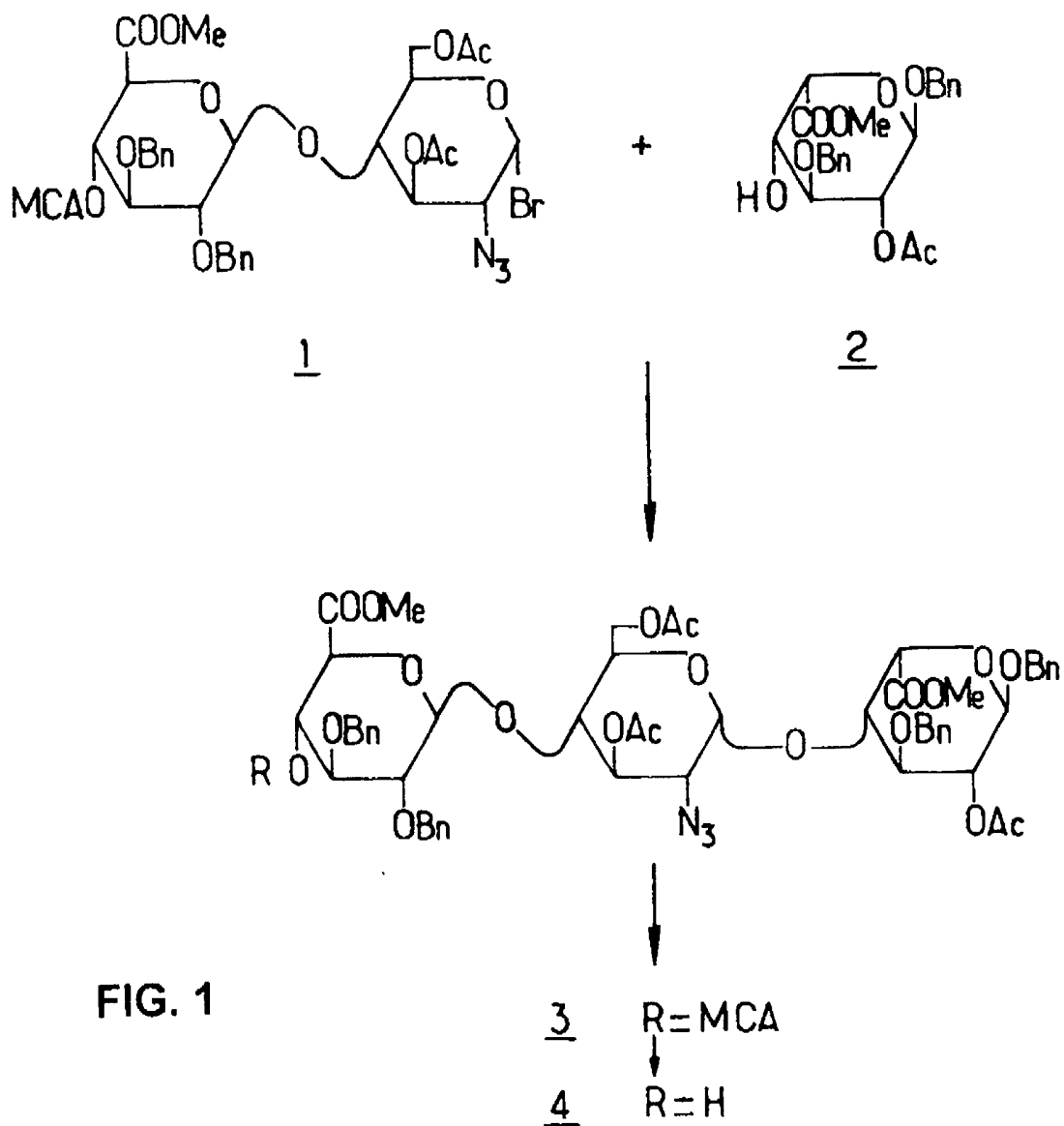
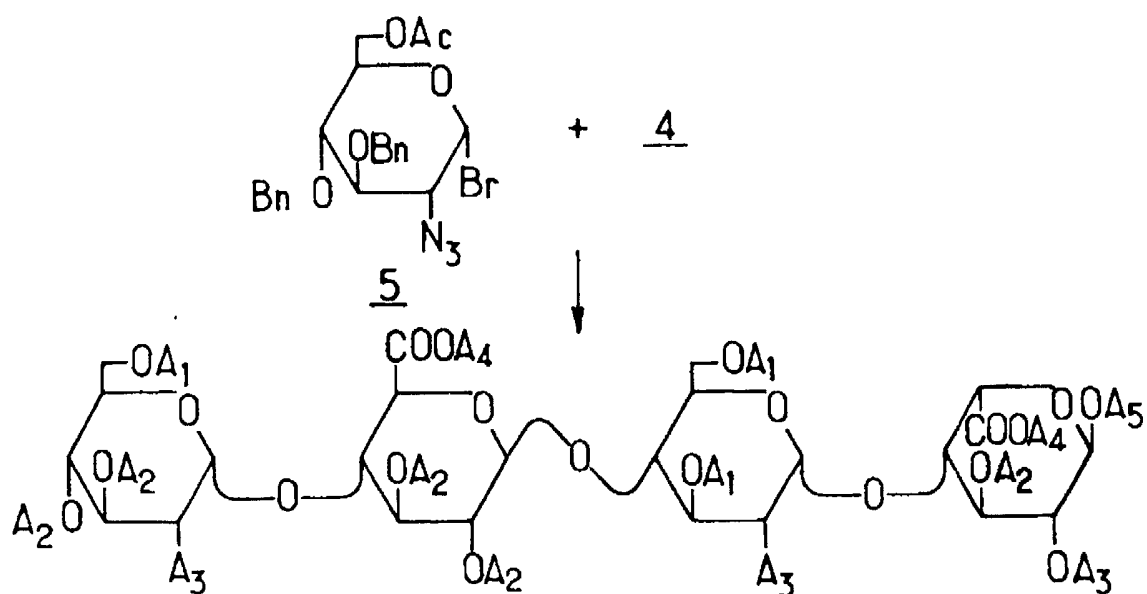


FIG. 1



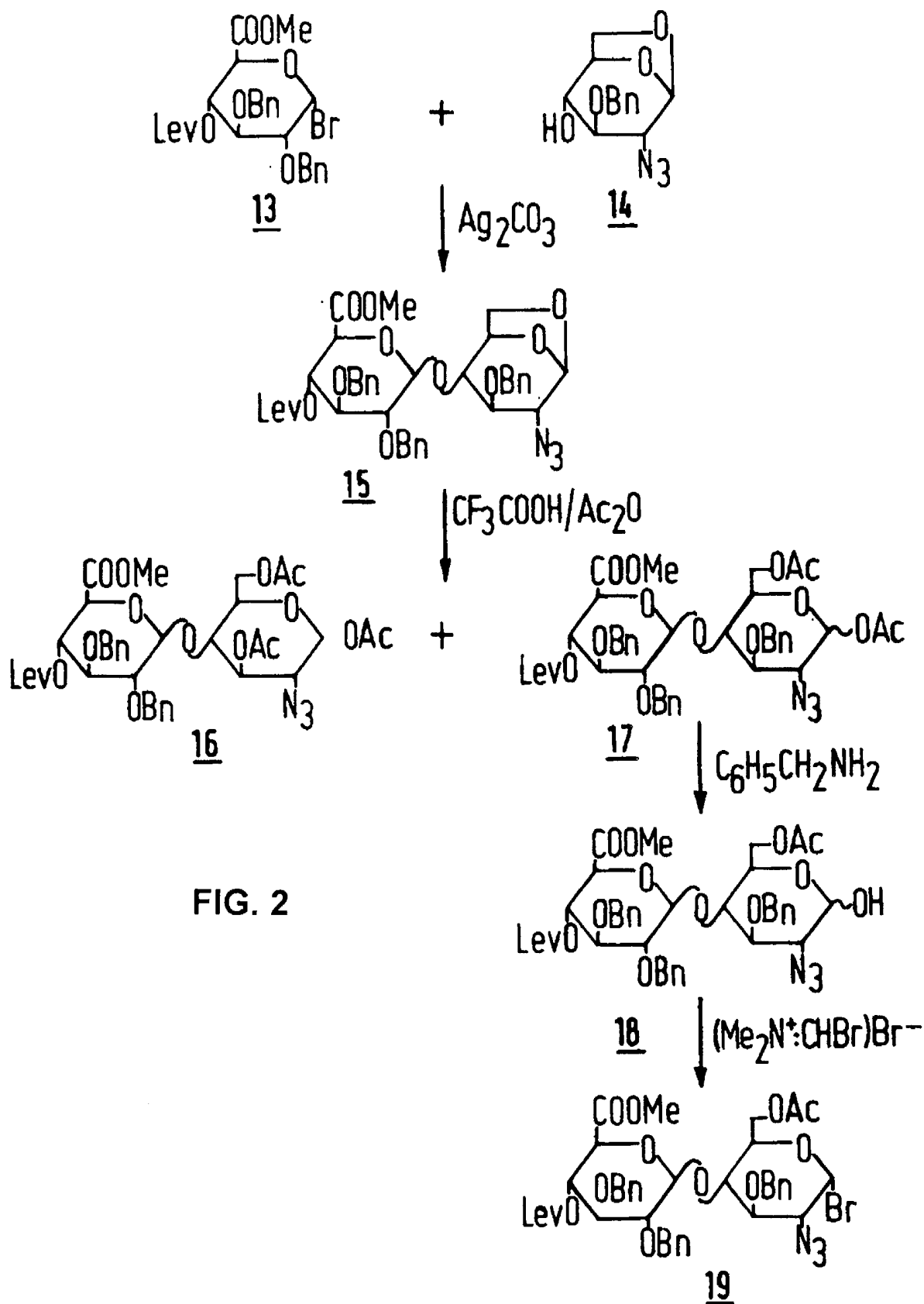


FIG. 2

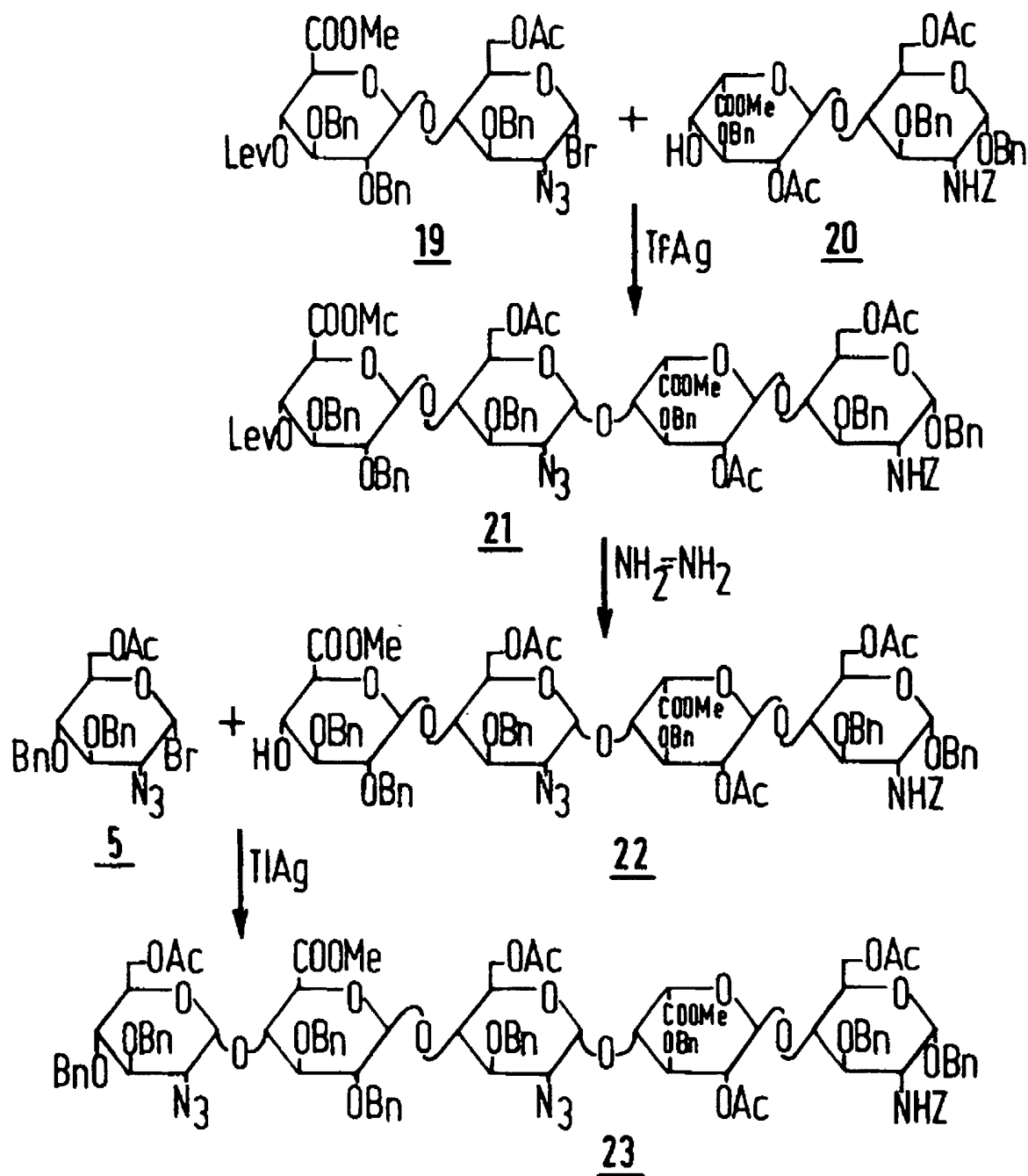


FIG. 3

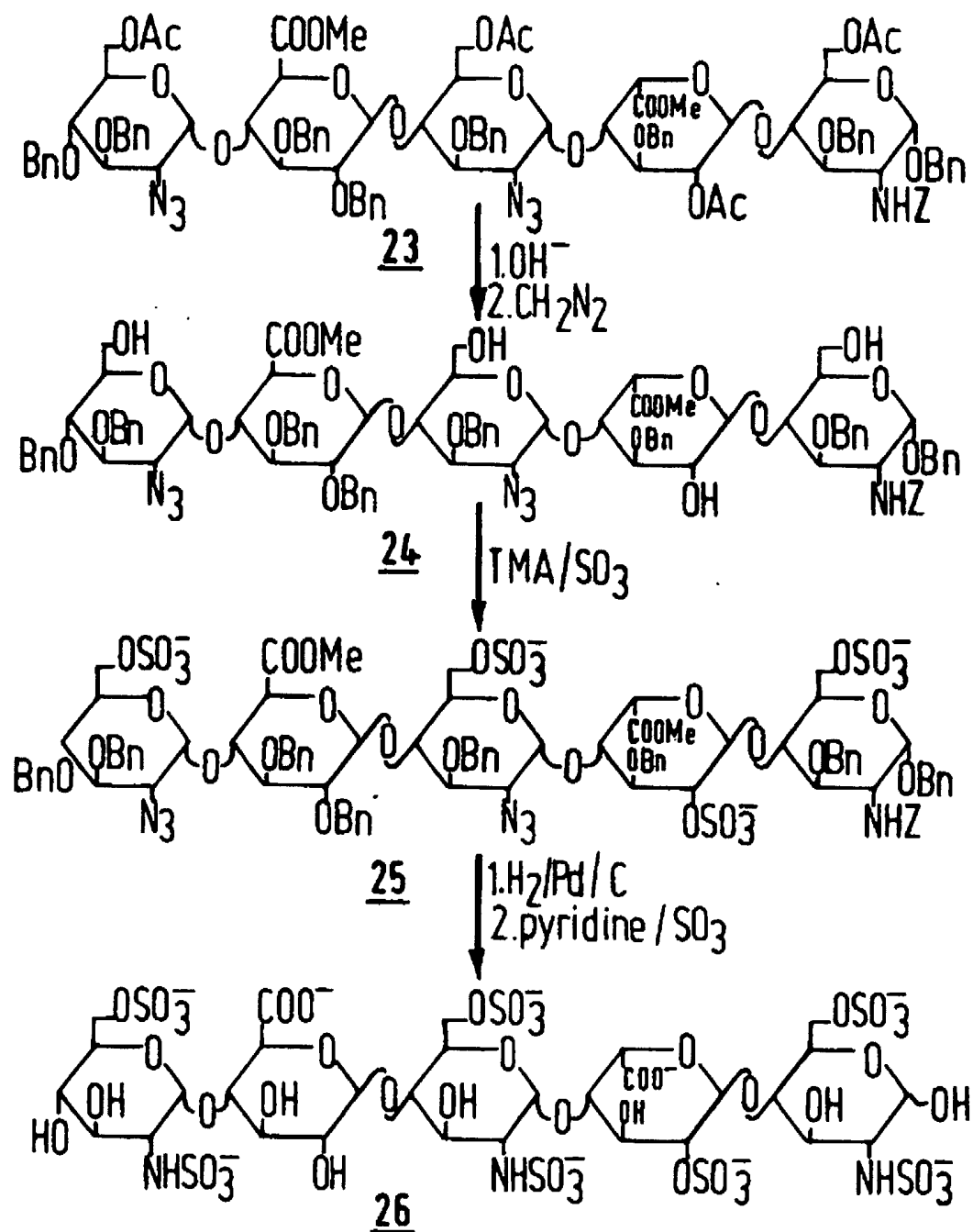


FIG. 4

FIG. 5

