

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 811470 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **811470**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁴)
C08B 37/10

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **13.05.1981**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **13.05.1981**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **15.11.1981**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

14.05.1980 FR 8010792

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Pharmindustrial, 35 Quai du Moulin de Cage 92231 Gennevilliers, France, RANSKA, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Mardiguian, Jean, France, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

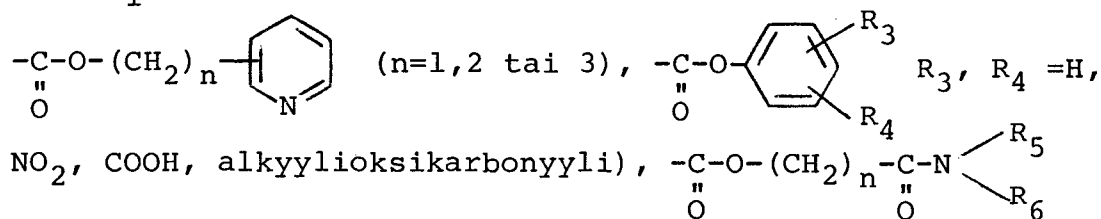
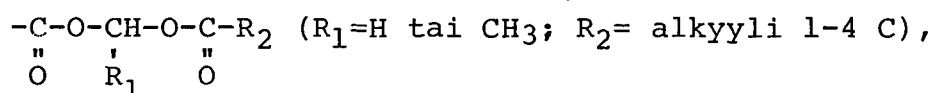
Uudet hepariinin esterit, joita voidaan käyttää lääkkeiden valmistamiseen ja menetelmä niiden valmistamiseksi.

Nya heparinestrar, vilka är användbara vid framställning av läkemedel och förfarande för framställning av desdessa.

Uudet hepariinin esterit, joita voidaan käyttää lääkkeiden valmistamiseen ja menetelmä niiden valmistamiseksi

Kyseessä olevan keksinnön kohteena ovat uudet hepariinin esterit ja niiden alkali-, maa-alkali-, magnesium-, kvaternääriset ammonium- ja amiinisuolat. Näitä yhdisteitä voidaan käyttää välituotteina lääkkeitä valmistettaessa.

Jo aikaisemmin ovat olleet tunnettuja (vrt. brittiläistä patenttia 973 894 ja ranskalaista lääkepatenttia 2739.M) hepariinin täydelleen esteröityneet metyyli- ja bentsyyliesterit. Samoin ovat tunnettuja (vrt. brittiläistä patenttia 1 501 095 ja ranskalaista patenttia 2 150 724) hepariinin esterit, jotka ovat syntyneet siten, että hepariinin kaavassa olevat karboksyyli-ryhmät on korvattu osittain tai kokonaan seuraavilla ryhmillä:

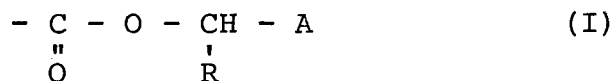


(n = 1, 2 tai 3; R₅, R₆ = alkyyli 1-4 C).

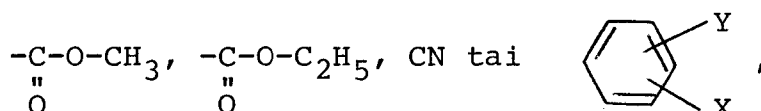
Nämä esterit ovat suurimmaksi osaksi pitkävaikutteisia koaguloitumista estäviä aineita.

Kyseessä olevan keksinnön mukaiset hepariinin esterit on johdettu hepariinista korvaamalla hepariinin kaa-

vassa olevat karboksyyli-ryhmät seuraavan kaavan mukaisilla ryhmillä:

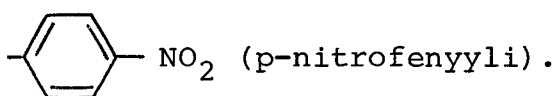
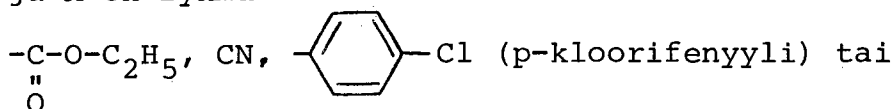


joissa R on vetyatomi tai metyyli-ryhmä, ja A on vetyatomi tai metyyli- tai fenyyli-ryhmä, tai



jossa X on klooriatomi tai nitro-ryhmä, alkyyli, joka sisältää 1-4 hiiliatomia tai metoksi ja Y on vetyatomi tai kloori, ja korvaaminen on osittainen tai täydellinen siinä tapauksessa että A ei ole vetyatomi tai metyyli- tai fenyyli-ryhmä ja osittainen korvaaminen vastaa karboksyyli-ryhmien esteröitymisastetta 10-90% siinä tapauksessa että A on vetyatomi tai metyyli- tai fenyyli-ryhmä.

Edellä olevassa kaavassa (I) on R etupäässä vetyatomi ja A on ryhmä



Edellä olevien estereiden alkali-, maa-alkali-, magnesium-, kvaternääriset ammonium- ja amiinisuolat kuuluvat myös keksintöön. Alkalisuoloista voidaan mainita erikoisesti natriumsuolat ja maa-alkalisuoloista kalsiumsuolat. Amiinisuoloista voidaan mainita tertiääriset amiinisuolat, erikoisesti trietyyliamiini-, pyridiini- tai imidatsolisuuolat. Kvaternäärisistä ammoniumsuoloista voidaan mainita pitkäketjuiset kvaternääriset alkyyli- tai aralkyyliammoniumsuolat, erikoisesti dodekyylitrimetyyliammoniumsuolat ja bentsetoniumsuolat ja settylipyridiniumsuolat.

Kyseessä olevan keksinnön mukaiset hepariinin esterit voivat olla ei-selektiivisiä tai selektiivisiä estereitä. Ei-selektiivisillä estereillä tarkoitetaan kyseessä olevan keksinnön piirissä niitä hepariinin estereitä, joissa ilman erotusta ovat esteröityneet D-glukuronihapon, ei-sulfatoituneen L-iduronihapon ja sulfatoituneen L-iduronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät. Selektiivisillä estereillä tarkoitetaan kyseessä olevan keksinnön piirissä niitä hepariinin estereitä, joissa ovat esteröityneet, osittain tai täydellisesti, joko ainoastaan D-glukuronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät, tai ainoastaan D-glukuronihapon ja ei-sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät, tai vielä yksinomaan ei-sulfatoidun L-iduronihapon ja sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät, tai lopuksi yksinomaan sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät.

Kyseessä olevan keksinnön mukaisia ei-selektiivisiä hepariinin estereitä voidaan valmistaa seuraavasti:

a) Valmistetaan ensiksi hepariinin hapon suola korvaamalla hepariinin happamet sulfaattiryhmät kvaternäärisillä ammoniumsulfaatti-ryhmillä, ja hepariinin karboksyyli-ryhmät jäävät vapaaseen muotoon. Tällaisen hepariinin happamen suolan valmistamiseen riittää esimerkiksi kun käsitellään hepariinin neutraalia suolaa, jossa hepariinin sulfaatti- ja karboksyyli-ryhmät on korvattu vastaavasti kvaternäärisillä ammoniumsulfaattiryhmillä ja kvaternäärisillä ammoniumkarboksylaattiryhmillä, hapon muodossa olevan karboksyylihapon kationien vaihtohartsin avulla.

b) Pannaan reagoimaan mainitun hepariinin happamen suolan kanssa alkoholi, jonka kaava on:



jossa R ja A merkitsevät samaa kuin kaavassa (I).

b)-vaiheen reaktio suoritetaan alhaisessa lämpötilassa (esimerkiksi 0°C:ssa) jossakin inertissä liuottimessa (esimerkiksi dimetyyliformamidissa tai metyleenikloridissa), jossa on mukana karbodi-imidi-tyyppistä kondensoitumista edistävää ainetta (esimerkiksi disykloheksyylikarbodi-imidiä). Karboksyyliyhymien esteröitymisaste on riippuvainen työskentelyolosuhteista (kaavan II mukaisesta alkoholista, reaktion kestoajasta, reagoivien aineiden määrasuhteista).

Vaiheessa b) saatu hepariinin esteri, jonka sulfaattiryhmät ovat kvaternäärisen ammoniumsulfaatin muodossa, voidaan muuttaa alkali-, maa-alkali-, magnesium- tai amiinisuolaksi tai ei-suolan muodossa olevaksi hepariinin esteriksi ennestään tunnetuilla menetelmillä. Esimerkiksi kun valmistetaan alkali-, maa-alkali- tai magnesiumsuoloja, annetaan hepariinin esterin kvaternäärisen ammoniumsulfaatin muodossa reagoida vastaavan asetaatin kanssa. Amiinisuoloja valmistettaessa annetaan hepariinin esterin kvaternäärisen ammoniumsulfaatin muodossa reagoida natriumasetaatin kanssa siten, että muodostuu natriumsuola, sitten annetaan H^+ -muodossa olevien sulfonihapon kationien vaihtohartsin vaikuttaa tähän natriumsuolaan siten, että muodostuu happoa, muutetaan suolaksi mainittu happo amiinin avulla ja eristetään muodostunut aine lyofilisoimalla tai saostamalla asetonin avulla.

Keksinnön mukaisia ei-selektiivisiä hepariinin estereitä valmistetaan etupäässä antamalla hepariinin neutraalin kvaternäärisen ammoniumsulan tai amiinisuolan, eli

hepariinin suolan, jossa kaikki hepariinin happoryhmät on muutettu suolaksi, reagoida halogeenijohdannaisen kanssa, jonka kaava on:



jossa Hal merkitsee kloori-, bromi- tai jodiatomia ja R ja A merkitsevät samaa kuin kaavassa (I). Reaktio voidaan esittää seuraavalla kaavalla:



Hep ja M merkitsevät vastaavasti edellä olevissa kaavoissa hepariinijäännöstä ja kvaternääristä ammoniumradikaalia tai amiiniradikaalia.

Hepariinin neutraalin kvaternäärisen ammoniumsuolan tai amiinisuolan reaktio halogeenijohdannaisen kanssa, jonka kaava on (III), tapahtuu joko inertin liuottimen liuoksessa tai suspensiossa lämpötilavälillä -20°C - $+60^{\circ}\text{C}$. Inerteinä liuottimina voidaan mainita erikoisesti dimetyyliformamidi, kloroformi, heksametyylifosforyyliamidi, metyleenikloridi, dimetyylisulfoksidi, tetrahydrofuraani ja aseton. Karboksyyli ryhmien esteröitymisaste on riippuvainen työskentelyolosuhteista (kaavan III mukaisen halogeenijohdannaisen laatu ja liuottimen laatu, reaktion kesto, reagoivien aineiden määrasuhde, lämpötila jne.).

Saatu hepariinin esteri, jonka sulfaattiryhmät ja mahdollisesti ei-esteröityneet karboksyyli ryhmät ovat kvaternäärisen ammonium- tai amiinisulfaatin tai -karboksylaatin muodossa, voidaan muuttaa alkalisuolaksi, maaalkalisuolaksi tai magnesiumsuolaksi, tai ei-suolan muodossa olevaksi hepariinin esteriksi ennestään tunnetuilla menetelmillä, erikoisesti edellä esitettyjen menetelmien avulla.

Edellä selotettujen menetelmien avulla valmistetut osittaiset tai täydelliset esterit voidaan muuttaa varovaisen hydrolyysin avulla estereiksi, joiden esteröitymisaste on heikompi. Tällainen varovainen hydrolyysi tapahtuu esimerkiksi antamalla mainittuihin osittaisiin tai täydellisiin estereihin vaikuttaa alkalikarbonaatin, erikoisesti dinatriumkarbonaatin vesiliuoksen, 30 minuutista 6 tuntiin, lämpötilavälillä 5°C - 25°C .

Keksinnön mukaisia selektiivisiä estereitä, joissa ovat esteröityneet, osittain tai kokonaan, joko yksinomaan D-glukuronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät, tai yksinomaan D-glukuronihapon ja ei-sulfatoituneen L-iduronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät, saadaan antamalla kaavan (III) mukaisen halogeenijohdannaisen, joka on määriteltä edellä, reagoida hepariinin happamen kvaternäärisen ammoniumsuolan kanssa, jossa ovat suolan muodossa paitsi sulfaattiryhmät, joko yksinomaan D-glukuronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät, tai yksinomaan D-glukuronihapon ja ei-sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät, ja muut karboksyyliiryhmät ovat hapon muodossa. Tämä reaktio suoritetaan samoissa olosuhteissa kuin kaavan (III) mukaisen halogeenijohdannaisen reaktio hepariinin neutraalin kvaternäärisen ammoniumsuolan kanssa.

Hepariinin happamia kvaternäärisiä ammoniumsuoloja, joissa ovat suolan muodossa paitsi sulfaattiryhmät, ainoastaan D-glukuronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät, saadaan antamalla kvaternäärisen ammoniumsuolan vaikuttaa hepariiniin vesiliuoksessa pH-arvolla 3-4.

Hepariinin happamia kvaternäärisiä ammoniumsuoloja, joissa ovat suolan muodossa, paitsi sulfaattiryhmät, yksinomaan D-glukuronihapon ja ei-sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät, saadaan antamalla

kvaternäärisen ammoniumsuolan vaikuttaa hepariinin vesiliuoksessa riittävän alhaisella pH-arvolla niin että muodostuu hepariinin kvaternäärinen ammoniumsuola, jossa ovat suolan muodossa vain sulfaattiryhmät (käytännössä pH-arvolla 2-2,5) ja sen jälkeen neutraloidaan selektiivisesti näin saadun aineen D-glukuronihapon ja ei-sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät lisäämällä laskettu määrä kvaternääristä ammoniumhydroksidia dimetyyliformamidi-väliaineessa. Tämä määrä lasketaan mainitun aineen jonkin määrätyn painomäärän neutralointikäyrästä dimetyyliformamidi-väliaineessa.

Keksinnön mukaisia selektiivisiä hepariinin estereitä, joissa ovat esteröityjä, osittain tai kokonaan, joko yksinomaan sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät tai yksinomaan ei-sulfatoidun L-iduronihapon ja sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät, valmistetaan antamalla kaavan (II) mukaisen alkoholin vaikuttaa hepariiniin vesiliuoksessa, jossa on mukana kondensoitumista edistävää ainetta, joka on vesiliukoisen karbodi-imidin tyyppiä, kuten esimerkiksi etyyli-1-(dimetyyliamino-3-propyyli)-3-karbodi-imidiä, ja väliaineen pH on säädetty arvoon 3,5-4,5 ensimmäisessä tapauksessa ja arvoon 2-3 toisessa tapauksessa. Kaavan (II) mukaisena alkoholina voidaan käyttää varsinkin metanolia ja etanolia, ja tällöin saadaan vastavasti hepariinin selektiivisiä metyyli- ja etyylieste- reitä.

Keksinnön mukaiset yhdisteet, kun niihin annetaan vaikuttaa natriumhydroksidin 0,1-n - 0,6-n vesiliuoksen lämpötilassa 20°C - 60°C tai jonkin orgaanisen emäksen kuten diatsa-1,5-bis(yklo/4,3,0)noneeni-5:n metyleenikloridissa, depolymeroituvat ja muuttuvat sulfatoitujen polysakkaridien seoksiksi, joiden keskimääräinen mole-

kyylipaino on alempi kuin hepariinin. Nämä seokset ovat antikoaguloimisaineita ja antitromboottisia aineita, joita voidaan käyttää tromboosien ehkäisyyn ja hoitoon.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä sitä rajoittamatta. Esimerkit 1-12 koskevat ei-selektiivisten estereiden valmistusta, esimerkit 13-20 selektiivisten estereiden valmistusta.

Lähtöaineena esimerkeissä 1, 6, 7 ja 8 käytetty hepariinin neutraali bentsetoniumsuola eli bentsetoniumheparinaatti on peräisin sian sisälmyksistä saadusta hepariinista, ja sen tyypilliset fysikaaliset ominaisuudet ovat seuraavat:

keskimääräinen molekyylipaino: 16 000 daltonia
ominaiskiertokyky vesiliuoksessa 20°C:ssa:

$$[\alpha]_D^{20} : + 41^{\circ}$$

antikoaguloimistehokkuus · codex = 157 u.i./mg

Esimerkeissä 2, 3, 4 ja 5 lähtöaineena käytetty hepariinin neutraali bentsetoniumsuola eli bentsetoniumheparinaatti on peräisin härän sisälmyksistä saadusta hepariinista, ja sen tyypilliset fysikaaliset ominaisuudet ovat seuraavat:

keskimääräinen molekyylipaino = 11 400 daltonia

$$[\alpha]_D^{20} = + 37^{\circ}$$

antikoaguloimistehokkuus · codex = 128 u.i./mg.

Esimerkeissä 10-12 lähtöaineena käytetty hepariinin neutraali bentsetoniumsuola eli bentsetoniumheparinaatti on peräisin sian limakalvoista saadusta hepariinista, ja sen keskimääräinen molekyylipaino on 16 000 dal-

tonia, ominaiskiertokyky vesiliuoksessa 20°C:ssa = +44° ja antikoaguloimistehokkuus codex on 180 u.i./mg.

Esimerkeissä 13-20 lähtöaineena käytetty hepariinin natriumsuola vastaa edellä mainittua sian limakalvosta saatua hepariinia.

Esimerkki 1

Liukseen, jossa on 30 g bentsetoniumheparinaattia 600 ml:ssa dimetyyliformamidia, lisätään 30 g (kloori-4)-bentsyylikloridia. Liukenemisen jälkeen annetaan olla kontaktissa 60 h ympäristön lämpötilassa (noin 20°C:ssa) ja lisätään sitten 600 ml 10-prosenttista natriumasetaatin liuosta metanolissa. Muodostunut sakka erotetaan suodattamalla, pestään metanolilla ja kuivataan vakuumissa. Näin saadaan 10,75 g hepariinin kloori-4-bentsyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Saadun aineen vesiliuoksen maksimiabsorptio on ultraviolettissa aallonpituudella 220 nm. Optinen tiheys tällä aallonpituudella on vesiliuoksella, joka sisältää 5 mg ainetta 100 ml:ssa vettä, 0,605 paksuuden ollessa 1 cm.

Esimerkki 2

Liukseen, jossa on 5 g bentsetoniumheparinaattia 125 ml:ssa dikloorimetaania, lisätään 5 g etyyliklooriasetaattia ja liukenemisen jälkeen annetaan olla kontaktissa 3 vrk ajan ympäristön lämpötilassa. Haihdutetaan liuotin vakuumissa, otetaan jäännös 75 ml:aan dimetyyliformamidia ja saostetaan se lisäämällä 75 ml 10-prosenttista natriumasetaattiliuosta metanolissa. Sakka, joka on erotettu suodattamalla, pestään metanolilla ja kuivataan sitten vakuumissa. Näin saadaan 1,72 g hepariinin karbetoksimetyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Esimerkki 3

Liuokseen, jossa on 10 g bentsetoniumheparinaattia 250 ml:ssa dikloorimetaania, lisätään 10 g (kloori-4)-bentsyylikloridia, joka liuotetaan sekoittamalla. Annetaan liuoksen levätä 24 h ympäristön lämpötilassa, ja haihdutetaan sitten liuotin vakuuissa. Jäännös otetaan 150 ml:aan dimetyyliformamidia ja se saostetaan lisäämällä 150 ml 10-prosenttista natriumasetaattiliuosta metanolissa. Suodatetaan ja pestään sakka metanolilla ja kuivataan vakuuissa ja saadaan 3,84 g hepariinin kloori-4-bentsyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Saadun aineen vesiliuoksella on maksimi absorptio ultraviolettissa aallonpituudella 220 nm. Optinen tiheys tällä aallonpituudella vesiliuoksella, joka sisältää 5 mg ainetta 100 ml:ssa vettä, on 0,337 paksuuden ollessa 1 cm.

Esimerkki 4

Liuokseen, jossa on 5 g bentsetoniumheparinaattia 125 ml:ssa dikloorimetaania lisätään 5 g (nitro-4)-bentsyylikloridia, joka liuotetaan sekoittamalla. Liuoksen annetaan sitten seistä 3 vrk ajan ympäristön lämpötilassa ja sitten haihdutetaan liuotin vakuuissa ja liuotetaan jäännös 75 ml:aan dimetyyliformamidia. Muodostunut esteri saostetaan lisäämällä 75 ml 10-prosenttista natriumasetaatin liuosta metanolissa. Sakka otetaan talteen suodattamalla, pestään metanolilla ja kuivataan vakuuissa. Saadaan tällä tavoin 1,89 g hepariinin nitro-4-bentsyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Saadulla aineella on maksimi absorptio ultraviolettissa aallonpituudella 272 nm. Optinen tiheys tällä aallonpituudella vesiliuoksella, joka sisältää 5 mg ainetta 100 ml:ssa vettä, on 408 paksuuden ollessa 1 cm.

Esimerkki 5

Liuokseen, jossa on 10 g bentsetoniumheparinaattia 250 ml:ssa dikloorimetaania, lisätään 10 g (kloori-4)-bentsyylikloridia, joka liuotetaan sekoittamalla. Liuoksen annetaan seisoa ympäristön lämpötilassa 24 h ajan, sitten haihdutetaan liuotin vakuuissa. Jäännös otetaan 200 ml:aan eetteriä ja erotetaan suodattamalla muodostunut sakka. Näin saadaan 10 g hepariinin kloori-4-bentsyyliesteriä bentsetoniumsuolan muodossa.

Esimerkki 6

Liuokseen, jossa on 120 mg bentsetoniumheparinaattia 2,4 l:ssa dimetyyliformamidia, lisätään 120 g (kloori-4)-bentsyylikloridia, joka liuotetaan sekoittamalla. Liuos jätetään sitten seisomaan ympäristön lämpötilassa 60 h ajaksi, sitten lisätään 2,4 l 10-prosenttista natriumasetaattiliuosta metanolissa. Muodostunut sakka erotetaan suodattamalla, pestään metanolilla ja kuivataan vakuuissa. Näin saadaan 46 g hepariinin kloori-4-bentsyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Saadulla aineella on vesiliuoksessa maksimi absorptio ultraviolettissa aallonpituudella 220 nm. Optinen tiheys tällä aallonpituudella vesiliuoksella joka sisältää 5 mg ainetta 100 ml:ssa vettä on 0,573 paksuuden ollessa 1 cm.

Esimerkki 7

Liuokseen, jossa on 30 g bentsetoniumheparinaattia 600 ml:ssa dimetyyliformamidia lisätään 30 g etyyliklooriasetaattia. Liukenemisen jälkeen annetaan olla kontaktissa 60 h ajan ympäristön lämpötilassa, sitten lisätään 600 ml 10-prosenttista natriumasetaattiliuosta metanolissa. Muodostunut sakka erotetaan suodattamalla, pestään metanolilla ja kuivataan vakuuissa. Näin saadaan 10,78 g hepariinin karbetoksimetyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Esimerkki 8

Liuokseen, jossa on 5 g bentsetoniumheparinaattia 125 ml:ssa dikloorimetaania, lisätään 5 g klooriasetonitriiliä, joka liuotetaan sekoittaen. Liuos jätetään 48 h ajaksi ympäristön lämpötilaan, sitten haihdutetaan liuotin vakuuissa. Jäännös liuotetaan 75 ml:aan dimetyyliformamidia ja saostetaan lisäämällä 75 ml 10-prosenttista natriumasetaatin liuosta metanolissa. Sakka erotetaan suodattamalla, pestään metanolilla ja kuivataan vakuuissa. Näin saadaan 1,63 g hepariinin syanometyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Esimerkki 9

Liuotetaan sekoittaen 3 g esimerkissä 6 saatua hepariinin kloori-4-bentsyyliesteriä 120 ml:an 10-prosenttista dinatriumkarbonaatin vesiliuosta. Sekoitetaan 2 h ajan lämpötilassa 20°C - 25°C ja säädetään sitten liuoksen pH arvoon 6 lisäämällä kloorivetyhapon N vesiliuosta, sen jälkeen vesiliuokseen nähden kaksinkertainen volyymi metanolia. Muodostunut sakka eristetään suodattamalla ja saadaan näin 2,1 g hepariinin kloori-4-bentsyyliesteriä.

Saadulla aineella on vesiliuoksessa maksimi absorptio ultraviolettissa aallonpituudella 220 nm. Optinen tiheys tällä aallonpituudella vesiliuoksessa, joka sisältää 5 mg ainetta 100 ml:ssa vettä, on 0,260 paksuuden ollessa 1 cm.

Esimerkki 10

Liuokseen, jossa on 10 g bentsetoniumheparinaattia 50 ml:ssa dikloorimetaania, lisätään 10 ml bentsyylikloridia. Liuotetaan ja jätetään liuos 96 h ajaksi ympäristön lämpötilaan, sen jälkeen lisätään 50 ml 10-prosenttista natriumasetatiliuosta metanolissa. Saatua sakka otetaan talteen suodattamalla, pestään meta-

nolilla ja liuotetaan uudestaan 20 ml:aan 10-prosenttista natriumkloridin vesiliuosta. Lisätään 50 ml metanolia ja eristetään suodattamalla 3,62 g hepariinin bentsyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Saadun aineen tyypilliset fysikaaliset ominaisuudet ovat:

Karboksyyliryhmien esteröitymisaste: 70 %

Absorptiospektri ultraviolettissa, vesiliuoksessa joka sisältää 50 µg/ml:

maksimi absorptio aallonpituudella 195 nm - 205 nm
optinen tiheys aallonpituudella 205 nm paksuuden ollessa 1 cm: 0,359.

Esimerkki 11

Liuokseen, joka sisältää 10 g bentsetoniumheparinaattia 50 ml:ssa dikloorimetaania, lisätään 0,9 ml metyylijodidia ja annetaan olla kontaktissa 24 h ajan ympäristön lämpötilassa. Sitten lisätään 50 ml 10-prosenttista natriumasetaatin liuosta metanolissa. Saatua sakkaa eristetään suodattamalla, pestään metanolilla ja liuotetaan uudelleen 20 ml:aan 10-prosenttista natriumkloridin vesiliuosta. Lisätään 50 ml metanolia ja otetaan talteen suodattamalla 3,38 g hepariinin metyyliesteriä natriumsuolan muodossa, jonka karboksyyliryhmien esteröitymisaste on 55 %.

Esimerkki 12

Liuokseen, jossa on 10 g bentsetoniumheparinaattia 50 ml:ssa dikloorimetaania, lisätään 1 ml etyylijodidia ja jätetään liuos 24 h ajaksi ympäristön lämpötilaan. Sitten lisätään 50 ml 10-prosenttista natriumasetaatin liuosta metanolissa. Muodostunut sakka erotetaan suodattamalla, pestään metanolilla ja liuotetaan uudelleen 20 ml:aan 10-prosenttista natriumkloridin vesi-

liuosta. Lisätään 50 ml metanolia ja otetaan talteen suodattamalla 3,45 g hepariinin etyyliesteriä natriumsuolan muodossa, jonka karboksyyli ryhmien esteröitymisaste on 45 %.

Esimerkki 13

Liukeseen, jossa on 10 g hepariinia (natriumsuolaa) 40 ml:ssa vettä lisätään 2,5 ml etikkahappoa ja sitten hitaasti ja sekoittaen 150 ml 10-prosenttista bentsetoniumkloridin vesiliuosta. Muodostunut sakka otetaan talteen sentrifugoimalla, pestään vedellä ja kuivataan. Saadaan 19,67 g hapanta bentsetoniumheparinaattia.

Liutetaan 5 g edellä olevaa ainetta 100 ml:aan dime-tyyliformamidia ja lisätään 5 g (kloori-4)-bentsyylikloridia. Annetaan olla kontaktissa 48 h ajan ympäristön lämpötilassa, sitten lisätään 100 ml 10-prosenttista natriumasetaatin metanoliliuosta. Muodostunut sakka erotetaan suodattamalla, pestään metanolilla ja kuivataan vakuumissa. Näin saadaan 2,11 g hepariinin (kloori-4)-bentsyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Saadun aineen tyypilliset fysikaaliset ominaisuudet:

Karboksyyli ryhmien esteröitymisaste: 22 %

Absorptiospektri ultraviolettissa vesiliuoksessa, joka sisältää 50 µg/ml:

maksimi aallonpituudella 196 nm-220 nm

optinen tiheys aallonpituudella 220 nm paksuuden ollessa 1 cm: 0,120.

Esimerkki 14

Liukeseen, jossa on 10 g hepariinia (natriumsuolaa) 40 ml:ssa vettä, lisätään 2,5 ml etikkahappoa, ja sitten hitaasti ja sekoittaen 150 ml 10-prosenttista bentsetoniumkloridin vesiliuosta. Muodostunut sakka otetaan

talteen sentrifugoimalla, pestään vedellä ja kuivataan. Näin saadaan 10,67 g hapanta bentsetoniumheparinaattia.

Liuotetaan 5 g edellä olevaa ainetta 25 ml:aan dikloorimetaania ja lisätään 2,2 ml metyylijodidia. Liuosta pidetään valolta suojattuna 24 h ajan ympäristön lämpötilassa. Lisätään 75 ml 10-prosenttista natriumasetaatin metanoliliuosta. Muodostunut sakka erotetaan suodattamalla, pestään metanolilla ja kuivataan vakuu-
missa. Saadaan 2 g hepariinin metyyliesteriä natriumsuolan muodossa (karboksyyli-ryhmien esteröitymisaste: 22 %).

Esimerkki 15

Liuokseen, jossa on 10 g hepariinia (natriumsuolaa) 40 ml:ssa vettä, lisätään 2,5 ml muurahaishappoa ja sitten hitaasti ja sekoittaen 150 ml 10-prosenttista bentsetoniumkloridin vesiliuosta. Otetaan talteen sakka sentrifugoimalla, pestään se vedellä ja kuivataan vakuu-
missa. Näin saadaan 20,5 g hapanta bentsetoniumheparinaattia. Liuotetaan 10 g edellä olevaa ainetta 200 ml:aan dimetyyli-formamidia, lisätään sitten 27,4 ml 0,1-n tetrabutyyliammoniumhydroksidin liuosta n-propanolin ja metanolin seoksessa.

Lisätään 10 g (kloori-4)-bentsyylikloridia ja jätetään 5 vrk ajaksi ympäristön lämpötilaan. Lisätään 250 ml 10-prosenttista natriumasetaatin metanoliliuosta. Erotetaan suodattamalla 4,50 g hepariinin (kloori-4)-bentsyyliesteriä natriumsuolan muodossa.

Saadun aineen tyypilliset fysikaaliset ominaisuudet:

Karboksyyli-ryhmien esteröitymisaste: 45 %

Absorptiospektri ultraviolettissa vesiliuoksessa, joka sisältää 50 µg/ml:

maksimi aallonpituudella 196 nm - 220 nm
 optimi tiheys aallonpituudella 220 nm paksuuden
 ollessa 1 cm: 0,265.

Esimerkit 16-20

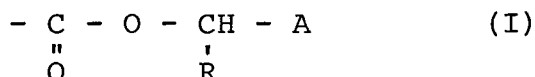
Liuokseen, jossa on 0,600 g hepariinia (natriumsuolaa) 7 ml:ssa vettä, jonka pH on säädetty haluttuun arvoon (vrt. alla olevaa taulukkoa) lisäämällä kloorivetyhapon N vesiliuosta, lisätään 0,300 g etyyli-1-(dimetyyli-amino-3-propyyli)-3-karbodi-imidiä.

Annetaan olla kontaktissa 1 h ajan ympäristön lämpötilassa ja lisätään 2,5 ml natriumkloridin vesiliuosta, jossa on 280 g/l, sitten 15 ml metanolia. Otetaan talteen muodostunut sakka suodattamalla, pestään se metanolilla ja kuivataan vakuumissa. Näin saadaan hepariinin metyyliestereitä natriumsuolan muodossa, joiden karboksyyli-ryhmien esteröitymisaste on ilmoitettu alla olevassa taulukossa.

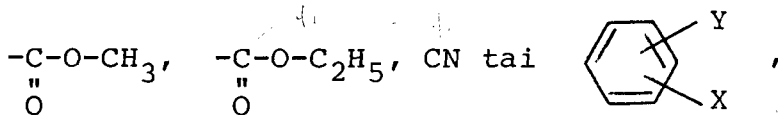
<u>Esi-</u> <u>merkki</u>	<u>Hepariinin vesi-</u> <u>liuoksen pH</u>	<u>Saadun esterin</u> <u>paino</u>	<u>Esteröi-</u> <u>tymisaste</u>
16	2,5	0,565 g	77 %
17	3	0,647 g	70 %
18	3,5	0,527 g	50 %
19	4	0,545 g	31 %
20	4,5	0,550 g	19 %

Patenttivaatimukset

1. Hepariinin esterit, t u n n e t u t siitä, että ne johdetaan hepariinista korvaamalla hepariinin karboksyyli-ryhmät ryhmillä, joiden kaava on:

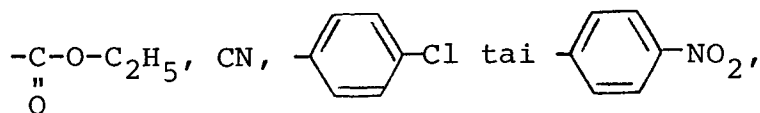


jossa R on vetyatomi tai metyyli-ryhmä ja A on vetyatomi tai metyyli- tai fenyyli-ryhmä, tai



X on klooriatomi tai nitro-ryhmä, alkyyli, jossa on 1-4 C-atomia tai metoksi ja Y on vety- tai klooriatomi, ja korvaaminen on joko osittainen tai täydellinen siinä tapauksessa, että A ei ole vetyatomi tai metyyli- tai fenyyli-ryhmä ja osittainen korvaaminen vastaa karboksyyli-ryhmien esteröitymisastetta 10 % - 90 % siinä tapauksessa, että A on vetyatomi tai metyyli- tai fenyyli-ryhmä, ja mainittujen estereiden alkali-, maa-alkali- ja magnesiumsuolat ja kvaternääriset ammonium- ja amiinisuolat.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset hepariinin esterit, t u n n e t u t siitä, että kaavan (I) mukaisissa ryhmissä R on vetyatomi ja A on ryhmä



ja mainittujen estereiden alkali-, maa-alkali- ja magnesiumsuolat, kvaternääriset ammonium- ja amiinisuolat.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset hepariinin esterit, t u n n e t u t siitä, että ne ovat ei-selektiivisiä estereitä ja mainittujen estereiden alkali-, maa-alkali- ja magnesiumsuolat, kvaternääriset ammonium- ja amiinisuolat.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset hepariinin esterit, tunnetut siitä, että ne ovat selektiivisiä estereitä, joissa ovat esteröityneinä, joko osittain tai kokonaan, yksinomaan D-glukuronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät ja mainittujen estereiden alkali-, maa-alkali- ja magnesiumsuolat, kvaternääriset ammonium- ja amiinisuolat.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset hepariinin esterit, tunnetut siitä, että ne ovat selektiivisiä estereitä, joissa ovat esteröityneinä, joko osittain tai kokonaan, yksinomaan D-glukuronihapon ja ei-sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät, ja mainittujen estereiden alkali-, maa-alkali- ja magnesiumsuolat ja kvaternääriset ammonium- ja amiinisuolat.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset hepariinin esterit, tunnetut siitä, että ne ovat selektiivisiä estereitä, joissa ovat esteröityneinä, joko osittain tai kokonaan, yksinomaan ei-sulfatoidun L-iduronihapon ja sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät, ja mainittujen estereiden alkali-, maa-alkali- ja magnesiumsuolat ja kvaternääriset ammonium- ja amiinisuolat.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset hepariinin esterit, tunnetut siitä, että ne ovat selektiivisiä estereitä, joissa ovat esteröityneinä, joko osittain tai kokonaan, yksinomaan sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyliiryhmät, ja mainittujen estereiden alkali-, maa-alkali- ja magnesiumsuolat ja kvaternääriset ammoniumsuolat ja amiinisuolat.

8. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1-7 mukaisten

estereiden alkalisuolat, t u n n e t u t siitä, että alkalinen kationi on natrium.

9. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-7 mukaisten estereiden maa-alkalisuolat, t u n n e t u t siitä, että maa-alkalikationi on kalsium.

10. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-7 mukaisten estereiden magnesiumsuolat.

11. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-7 mukaisten estereiden kvaternääriset ammoniumsuolat, t u n n e t u t siitä, että kvaternäärinen ammoniumkationi on bentsetoniumkationi.

12. Menetelmä, jonka avulla voidaan valmistaa patenttivaatimuksen 3 mukaisia yhdisteitä, t u n n e t t u siitä, että

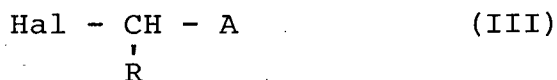
- a) valmistetaan hepariinin hapan suola korvaamalla hepariinin happamet sulfaattiryhmät kvaternäärisillä ammoniumsulfaattiryhmillä ja hepariinin karboksyyli-ryhmät pysyvät vapaassa muodossa,
- b) annetaan mainitun hepariinin happamen suolan reagoida alkoholin kanssa, jonka kaava on:



jossa R ja A merkitsevät samaa kuin patenttivaatimuksen 1 kaavassa (I),

- c) muutetaan mahdollisesti näin saatu hepariinin esterin kvaternäärinen ammoniumsuola mainitun esterin alkali-, maa-alkali- tai magnesium- tai amiinisuolaksi, tai ei-suolan muodossa olevaksi hepariinin esteriksi.

13. Patenttivaatimuksen 3 mukaisten yhdisteiden valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että pannaan reagoimaan hepariinin neutraalinen kvaternäärinen ammoniumsuola tai amiinisuola halogeenijohdannaisen kanssa, jonka kaava on:



jossa Hal merkitsee kloori-, bromi- tai jodiatomia ja R ja A merkitsevät samaa kuin patenttivaatimuksen 1 kaavassa (I), ja muutetaan mahdollisesti näin saatu hepariinin esterin kvaternäärinen ammoniumsuola tai amiinisuola mainitun esterin alkali-, maa-alkali- tai magnesiumsuolaksi tai ei-suolan muodossa olevaksi hepariinin esteriksi.

14. Patenttivaatimuksen 3 mukaisten yhdisteiden valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että jomman kumman patenttivaatimuksen 12 tai 13 mukaisen menetelmän mukaan saadut yhdisteet hydrolysoidaan varovaisesti.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että varovainen hydrolyysi suoritetaan käyttämällä alkalikarbonaatin vesiliuosta.

16. Patenttivaatimuksen 4 mukaisten yhdisteiden valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että annetaan halogeenijohdannaisen, jonka kaava on:



jossa Hal on kloori-, bromi- tai jodiatomi ja R ja A merkitsevät samaa kuin patenttivaatimuksen 1 kaavassa (I), reagoida hepariinin happamen kvaternäärisen ammoniumsuolan kanssa, jossa ovat suolan muodossa, paitsi sulfaattiryhmät, yksinomaan D-glukuronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät.

17. Patenttivaatimuksen 5 mukaisten yhdisteiden valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että annetaan halogeenijohdannaisen, jonka kaava on:



jossa Hal on kloori-, bromi- tai jodiatomi ja R ja A merkitsevät samaa kuin patenttivaatimuksen 1 kaavassa (I), reagoida hepariinin happamen kvaternäärisen ammoniumsuolan kanssa, jossa ovat suolan muodossa, paitsi sulfaattiryhmät, yksinomaan D-glukuronihapon ja ei-sulfatoidun L-iduronihapon renkaiden karboksyyli-ryhmät.

18. Patenttivaatimuksen 6 mukaisten yhdisteiden valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että annetaan alkoholin, jonka kaava on:



jossa R ja A merkitsevät samaa kuin patenttivaatimuksen 1 kaavassa (I), reagoida hepariinin kanssa vesiliuoksessa jossa on mukana kondensoitumista edistävää ainetta, joka on vesiliukoisen karbodi-imidin tyyppiä ja väliaineen pH on välillä 2-3.

19. Patenttivaatimuksen 7 mukaisten yhdisteiden valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että annetaan alkoholin, jonka kaava on:



jossa R ja A merkitsevät samaa kuin patenttivaatimuksen 1 kaavassa (I), reagoida hepariinin kanssa vesiliuoksessa, jossa on mukana vesiliukoisen karbodi-imidin tyyppiä olevaa kondensoitumista edistävää ainetta ja väliaineen pH on välillä 3,5-4,5.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

K 1768 806 (C08B 33/10)

DK

FR

M 2739 (A61K)

GB

P 1501095 (C08B 33/10)

NO

SE

US

P 3835112 (C08B 19/03)

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chem. Abstr. vol 77, 12/1990 w

Teemu Piipponen

Allekirjoitus