



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104144950 B

(45)授权公告日 2017.09.05

(21)申请号 201280062050.1

(22)申请日 2012.12.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104144950 A

(43)申请公布日 2014.11.12

(30)优先权数据
61/577,223 2011.12.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.06.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SE2012/051433 2012.12.19

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/095279 EN 2013.06.27

(73)专利权人 迪乐方有限责任公司
地址 瑞典,索尔纳

(72)发明人 H-P·埃克勒 P-O·埃里克森
U·林达尔 E·霍尔默

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟 李媛

(51)Int.Cl.
C08B 37/10(2006.01)
A61K 31/727(2006.01)
A61P 15/04(2006.01)

(56)对比文件
US 4990502 A, 1991.02.05,
CN 1186502 A, 1998.07.01,
CN 101842392 A, 2010.09.22,
张万忠等.肝素降解和低分子量肝素的制
备.《中国生化药物杂志》.2001,第22卷(第1期),

审查员 陈佳佳

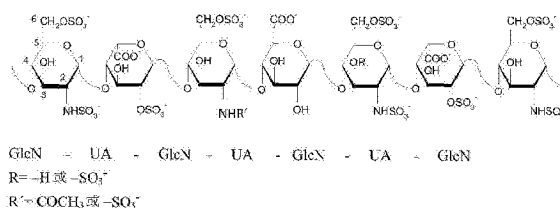
权利要求书2页 说明书17页 附图3页

(54)发明名称

含有重复的二糖单元的非抗凝的葡糖胺聚糖及其医药用途

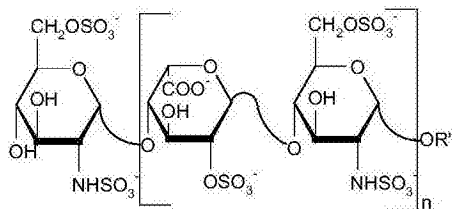
(57)摘要

本发明涉及化学修饰的葡糖胺聚糖,其具有10IU/mg以下的抗因子II活性、10IU/mg以下的抗因子Xa活性和约4.6至6.9kDa的平均分子量(Mw,重均分子量)。本发明还公开了制备修饰的葡糖胺聚糖的方法及其医药用途。

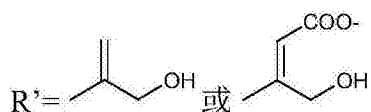


1. 一种化学修饰的葡糖胺聚糖, 其为化学修饰的肝素或硫酸乙酰肝素, 所述化学修饰的葡糖胺聚糖具有:

- (i) 10IU/mg以下的抗因子IIa活性;
- (ii) 10IU/mg以下的抗因子Xa活性; 和
- (iii) 4.6 ± 0.46 至 6.9 ± 0.69 kDa的重均分子量(Mw); 和其中:
- (iv) 所述化学修饰的葡糖胺聚糖的主要出现的糖为(式I):



其中



n 是2至20的整数, 因此多糖链具有2至20个二糖单元, 对应于1.2至12kDa之间的分子量; 和

(v) 所述多糖链基本上不含来自调节抗凝血作用的五糖序列的完整的非硫酸化艾杜糖醛酸和/或葡萄糖醛酸, 这是指完整的非硫酸化艾杜糖醛酸和/或葡萄糖醛酸的含量在 ^{13}C -NMR波谱中是不可检测到的量; 和

(vi) 所述化学修饰的葡糖胺聚糖具有根据下表所示的多糖分布及其相应的以重量累积%表示的分子量:

分子量 kDa	累计重量 %
> 10	4-15
> 8	10-25
> 6	22-45
> 3	> 70

2. 根据权利要求1所述的化学修饰的葡糖胺聚糖, 其中主要出现的多糖链具有6至12之间个分子量为3.6-7.2kDa的二糖单元。

3. 根据权利要求1-2任一项所述的化学修饰的葡糖胺聚糖, 其包含非还原性末端不饱和和葡糖胺, 其在 ^1H -NMR波谱中的5.0至6.5ppm之间存在信号, 所述信号具有相对于来自天然肝素的5.42ppm处的信号4%以下的强度。

4. 根据权利要求3所述的化学修饰的葡糖胺聚糖, 其中所述修饰的葡糖胺在 ^1H -NMR波谱中的5.95ppm和6.15ppm处存在信号。

5. 根据权利要求1-2任一项所述的化学修饰的葡糖胺聚糖, 其中所述化学修饰的葡糖胺聚糖为肝素。

6. 根据权利要求3所述的化学修饰的葡糖胺聚糖, 其中所述化学修饰的葡糖胺聚糖为

肝素。

7. 根据权利要求4所述的化学修饰的葡糖胺聚糖, 其中所述化学修饰的葡糖胺聚糖为肝素。

8. 一种制备化学修饰的硫酸化的葡糖胺聚糖的方法, 所述硫酸化的葡糖胺聚糖选自肝素和硫酸乙酰肝素, 所述化学修饰的硫酸化的葡糖胺聚糖具有10IU/mg以下的抗因子IIa活性、10IU/mg以下的抗因子Xa活性, 以及 4.6 ± 0.46 至 6.9 ± 0.69 kDa的重均分子量(Mw), 所述方法包含以下顺序的步骤:

(a) 通过用高碘酸盐处理, 氧化葡糖醛酸和艾杜糖醛酸,

(b) 碱性条件下多糖链的解聚, 和

(c) 通过与还原剂的反应还原并稳定末端醛基,

通过控制在步骤a) 的结束和步骤c) 的开始之间的暴露时间消除或最小化氧化含碘化化合物的影响。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述暴露时间为 1 ± 0.1 小时至 6 ± 0.6 小时。

10. 根据权利要求8-9任一项所述的方法, 其中于 10°C 以上的温度进行高碘酸盐氧化。

11. 根据权利要求8-9任一项所述的方法, 其中在初始葡糖胺聚糖浓度为 10 ± 1 - $20 \pm 2\%$ w/v的溶液中进行高碘酸盐氧化。

12. 根据权利要求8-9任一项所述的方法, 其中所述氧化过程进行至少15小时。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述氧化过程进行 18 ± 1.8 - 24 ± 2.4 小时。

14. 根据权利要求8-9任一项所述的方法, 其中于 $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的温度, 以 $15 \pm 1.5\%$ 的葡糖胺聚糖浓度, 于 5 ± 0.5 的pH, 进行高碘酸盐氧化 18 ± 1.8 - 24 ± 2.4 小时。

15. 根据权利要求8-9任一项所述的方法, 其中于 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 以上的温度进行解聚。

16. 根据权利要求8-9任一项所述的方法, 其中使葡糖胺聚糖衍生物富集具有 1.2 ± 0.12 至 12 ± 1.2 kDa的分子量的多糖链。

17. 根据权利要求8-9任一项所述的方法, 其中所述葡糖胺聚糖是肝素。

18. 根据权利要求8-17任一项所述的方法制备的化学修饰的葡糖胺聚糖。

19. 一种药物组合物, 其包含治疗有效量的根据权利要求1-7或18任一项所述的化学修饰的硫酸化葡糖胺聚糖和治疗学上可接受的载体。

20. 根据权利要求1-7或18任一项所述的化学修饰的葡糖胺聚糖在制备用于不依赖于抗凝血作用的医药治疗的药物中的用途。

21. 根据权利要求1-7或18任一项所述的化学修饰的葡糖胺聚糖用于制备治疗和预防选自难产和其中内皮和上皮层蛋白漏出为并发症的病症的疾病的药物中的用途。

22. 根据权利要求21所述的用途, 其中所述其中内皮和上皮层蛋白漏出为并发症的病症选自Gorham Stout综合征、脓毒病和蛋白丢失性肠病。

含有重复的二糖单元的非抗凝的葡糖胺聚糖及其医药用途

技术领域

[0001] 本发明涉及新的具有低抗凝活性的修饰的葡糖胺聚糖及其制备方法。特别地,所述制备方法适合于生产具有例如胃肠外注射后高生物利用度的和产生有利的储存和处理特性的高结构稳定性的修饰的肝素和硫酸肝素。

背景技术

[0002] 肝素是多分散的、天然存在的抑制凝血的多糖,经由所述凝血过程发生血栓形成。肝素由不同长度和分子量的无支链多糖链组成。分子量从5000至超过40,000道尔顿的链构成了医药级肝素。

[0003] 天然来源的肝素(主要是猪肠或牛肺组织)可在治疗上施用以预防和治疗血栓形成。然而,未分级肝素(unfractionated heparin)的作用是难以预料的。在用未分级肝素治疗血栓形成期间,必须非常密切地监测凝血参数以防止过强或过弱抗凝。

[0004] 众多品牌的肝素和低分子量肝素(LMWH),如达肝素和依诺肝素可用于依赖于它们的抗凝血活性的治疗方法。大量体外和动物实验研究,甚至临床试验表明,肝素及其衍生物还具有与其抗凝血作用相关的那些特性以外的有益特性。然而,由于与抗凝血作用相关的出血风险,现有的肝素和LMWH不适合用于治疗其它医学病症。尽管LMWH与肝素相比代表了显著的临床优势,但是这一类物质,顾名思义,仍保留可引起潜在的威胁生命的副作用的较高的抗凝血活性。

[0005] 因为LMWH可以皮下给予,并且不需要APTT监测,因此LMWH允许深静脉血栓形成或肺栓塞等病症的门诊治疗,所述病症以前施用未分级肝素强制性住院治疗。

[0006] LMWH达肝素已被证明减少接受预防深静脉血栓形成的妇女的滞产。该机制被认为是涉及到达肝素诱导的增加的白介素水平,这导致有利的炎症反应,并促进子宫颈成熟。另外,达肝素已被证明能增加子宫的收缩力(*Acta Obstetricia et Gynecologica*, 2010;89:147-150)。

[0007] 然而,出于若干原因,肝素和LMWH不适合用于预防或治疗这样的疾病。首先,由于出血风险,肝素和LMWH具有显著的、众所周知的抗凝血作用,限制其在妊娠晚期及分娩过程中使用(无论是预防还是急性使用)。例如当给予硬膜外麻醉时(在孩子出生经常采取的措施),严格禁止使用达肝素。第二,肝素已与肝素引起的血小板减少联系起来,所述血小板减少是可以发生在任何肝素暴露的病人中的严重的免疫介导的药物反应。其是在病人使用肝素5天或以上或者如果病人之前已经肝素暴露而发展起来的,由肝素依赖性抗体引起的潜在毁灭性的凝血疾病。肝素长期治疗的另一种可能的不良影响是,它可能会导致骨头的去矿化,造成骨质疏松。

[0008] 已经有许多尝试,以消除或减少肝素或低分子量肝素的抗凝血活性,以提供低抗凝肝素(LAH),其目的是从肝素链的抗凝血作用以外的其它潜在临床效果中获益,而不具有与肝素有关的不良反应的风险(主要是出血)。然而,限于这种类型的肝素的临床经验,至今没有这样的产品被允许用于临床。

[0009] 欧洲专利1059304公开了酶促降解或氧化肝素从而得到具有低的抗凝血作用的产品,其具有9至13kDa的平均分子量,其被建议用于神经退行性疾病的治疗。

[0010] 美国专利4,990,502阐明了一种处理天然肝素的方法,以裂解负责抗凝血作用的五糖残基的残基和随后的解聚,其得到低抗凝血、平均分子量5.8至7.0kDa的低分子量肝素。在US4,990,502耗时的方法中,需要约15小时的渗析以终止氧化过程。这样的过程会影响最终产品的分子量分布。控制多糖链的分子量和长度是获得合意的化合物的生物效应的关键。

[0011] 长链肝素皮下给药后的生物利用度低,肝素诱导的血小板减少症(HIT)诱导的可能性也与链长度正相关。为了减少这些临床上不需要的性质,肝素衍生物不应该是全长度的。某些分子量的肝素链可以通过标准肝素分级分离得到。然而,通过分级分离方法如凝胶过滤法、醇沉淀和离子交换色谱法制得的中间或低分子量肝素衍生物与原料的显著浪费有关,因为高分子量肝素被因此丢弃。

[0012] 本发明,如在下面的段落中所概述的,描述了一种新的方法,其中多糖链被缩短,并且将获得一个合适的平均分子量分布,以有利于其临床应用并减少与最大多糖链有关的风险,以及原料损失最小化。

附图说明

[0013] 图1显示根据本发明的低抗凝血肝素的合成方案。

[0014] 图2显示药物物质的稳定性研究结果。

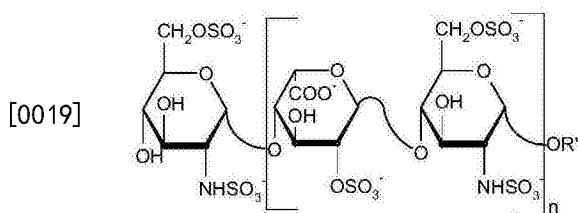
[0015] 图3显示药物产物的稳定性研究结果。

发明内容

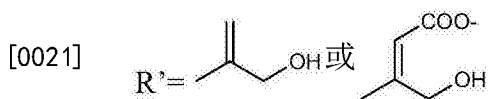
[0016] 本发明涉及化学修饰的选自肝素和硫酸乙酰肝素的葡糖胺聚糖,其具有10IU/mg以下的抗因子IIa活性,10IU/mg以下的抗因子Xa活性,和约4.6至6.9kDa的平均分子量(重均分子量,Mw),其中:

[0017] -对应于1.2至12kDa之间的分子量,多糖链具有2至20个(式I中的n)聚合二糖单元;

[0018] -主要出现的糖为(式I)



[0020] 其中



[0022] n是2至20的整数。

[0023] 本发明进一步涉及其用途和其制备方法。

具体实施方式

[0024] 概括地说,本发明涉及化学修饰的肝素和硫酸乙酰肝素,其被选择性地制备以保持多糖链的治疗效果并产生多糖链的最佳粒径分布,以确保高的生物利用度和稳定性,同时还具有低的抗凝血作用,从而从根本上消除出血的风险。

[0025] 本发明还将确保高产率的方法,其可以在有利的产品成本下被放大以产生销售产品。生产成本和原材料的供应成为获得药物产品的重要因素。能够将未分级肝素修饰成具有良好的链长分布的药学上可接受的衍生物,使得胃肠外给药具有高的生物利用度。而且这将使得能够诊所外治疗,如自我治疗,这从社会经济的角度来看是有利的。

[0026] 一些术语和定义用于如下一般和详细描述的本发明的文本中以及实验文本中。

[0027] 但必须指出的是,如在本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式“一(a)”,“一(an)”和“该(the)”包括复数指代,除非上下文另有明确规定。

[0028] 此外,在适用的情况下,术语“约”用于表示一个给定值的 $\pm 2\%$ 的偏差,优选数值的 $\pm 5\%$ 的偏差,最优选数值的 $\pm 10\%$ 的偏差。

[0029] 肝素是在人类和动物中,在所谓的肥大细胞中,细胞内合成并储存的天然存在的葡糖胺聚糖。制备工业中,其大多来自猪肠黏膜,肝素是一种有效的抗凝血剂,并已经作为优选的预防和治疗血栓栓塞性疾病的药物用于临床60余年。肝素治疗的主要潜在副作用是其抗凝血特性引起的出血并发症。

[0030] 肝素是高度多分散性的并由分子量范围在5至40kDa(平均大约在15至18kDa)的多糖异质群体组成。

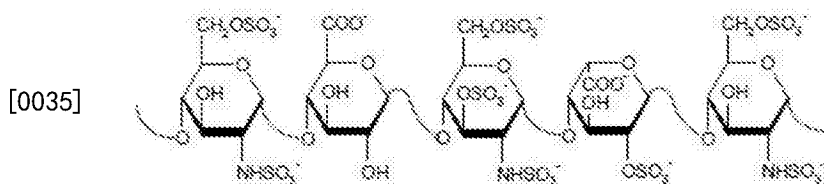
[0031] 根据欧洲药典的低分子量/质量肝素(LMWH)被定义为“具有质量平均分子质量8kDa以下的硫酸化葡糖胺聚糖的盐并且其中总质量的至少60%具有8kDa以下的分子量。它们的多糖链的还原性或非还原性末端展现出不同的化学结构。参照干燥物质计算,其效力为每毫克抗因子Xa活性不在70IU以下。抗因子Xa活性与抗因子IIa活性之比不小于1.5”。临床上使用的LMWH的分子量范围为3~15kDa,平均约4~7kDa。通过肝素的受控解聚而生产,LMWH展现出相比于未分级肝素更有利的药理学和药代动力学性质,包括皮下注射后更低的诱发出血倾向,提高的生物利用度和延长的半衰期。

[0032] 硫酸乙酰肝素是直链多糖,整体比肝素较少硫酸化,其可以从猪肠粘膜或牛肺,使用如Fransson等人,Structural studies on heparin sulfates,Eur.J.Biochem.106,59-69(1980)所描述的氯化十六烷基吡啶分级分离和顺序盐萃取从肝素侧分离部分来制备。硫酸乙酰肝素由交替的葡糖胺和糖醛酸残基构成,所得到的二糖单元是被N-乙酰化、N-硫酸化或(在较小程度上)N-非取代的,并且其主要以domain-wise(无对应中译文)方式排列。取决于特定的抗凝血五糖的存在,一些硫酸乙酰肝素具有抗凝血活性,但比肝素低的多。

[0033] 肝素主要通过高亲和力结合并活化丝氨酸蛋白酶抑制剂,抗凝血酶(AT),而发挥其抗凝活性。AT,一种血液凝固的重要生理抑制剂,通过与激活的凝血因子形成稳定的络合物而中和这些因子。将特定的五糖与肝素的多糖链结合引起AT的构象变化,这极大地增加了抑制凝血因子的速率,从而减弱血液凝固和血栓的形成。

[0034] 随机分布于肝素聚合物内的、独特的、特定的五糖序列,对于结合于AT必不可少。这个序列的一些结构特征已被证明对于肝素与AT的相互作用至关重要。值得注意的是,存

在于该五糖序列中的艾杜糖醛酸残基一致地在C-2位硫酸化,而在葡萄糖醛酸的C-2和C-3位的羟基是未取代的(式II)。



[0036] 式II

[0037] 与抗凝血活性相匹配的结构变体包括朝向非还原性末端的GlcN单元的N-乙酰基而不是N-硫酸化取代,和在其他两个GlcN单元的未被取代的C6-羟基而不是6-O-硫酸化C6-羟基。

[0038] 通过应用本文所公开的方法,与AT的相互作用被禁止,因此抗凝活性基本上被耗尽。

[0039] 在本发明的上下文中,葡糖胺聚糖的抗凝血剂活性涉及AT增效抑制凝血因子Xa和IIa(凝血酶)的临床功能。在一个实施方案中,根据本发明的化学修饰的葡糖胺聚糖基本上无抗凝血活性。

[0040] 在制备低抗凝血肝素的过程中,避免或抵消非特异性解聚是很重要的,即解聚效应不归因于从碱性 β -消除的水解(解聚步骤本身)得到的可预测的结果。非特异性解聚可能导致不可预知的分子量损失,变色制品(具有不稳定的吸光度值),其他的稳定性问题和不明残余物的出现,以及从肝素或低分子量肝素的处理得到的不可预测的残余物的出现。经历非特异性解聚的产物可以得到不利的和不稳定的多糖分子量分布。

[0041] 本发明的一个重要方面是控制解聚以获得具有最佳链分布和良好的稳定性特征的产品。在一个方面中,通过控制高碘酸盐以及所得碘酸盐被允许发挥其对肝素的氧化攻击的条件来控制解聚。根据本发明的方法已经被优化以使负面影响链分布和稳定性的非特异性解聚最小化。

[0042] 其他术语将在如下说明书中的相关文本中被定义。

[0043] 在一个方面,本发明涉及一种制备化学修饰的葡糖胺聚糖的方法,所述葡糖胺聚糖选自肝素和硫酸乙酰肝素,所述化学修饰的葡糖胺聚糖具有10IU/mg以下的抗因子IIa活性、10IU/mg以下的抗因子Xa活性,以及约4.6至约6.9kDa的平均分子量(重均分子量,MW)。所述方法通常包含通过使其经受能够氧化非硫酸化糖醛酸的氧化剂而选择性氧化存在于水性溶液中的未分级肝素或硫酸乙酰肝素和将得到的氧化糖还原的步骤。该方法还通常包含通过碱水解使肝素链解聚。

[0044] 在一个方面,所述方法包含以下步骤:

[0045] • 通过用高碘酸盐处理,氧化葡萄糖醛酸和艾杜糖醛酸,

[0046] • 消除或最小化氧化含碘化合物的影响,

[0047] • 碱性条件下多糖链的解聚(β 消除过程),和

[0048] • 通过与还原剂,如NaBH₄的反应还原并稳定末端醛基。

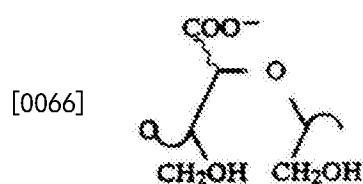
[0049] 在另一个方面,所述方法还包含一个或多个以下步骤:

[0050] • 通过除去硼酸盐(氧化硼氢化钠),去除小葡糖胺聚糖片段,加入反离子的方法最终纯化产物并分离到固体形式的产物。

- [0051] • 真空和加热下干燥产物,或冷冻干燥程序干燥产物以长期储存产物
- [0052] • 在水性磷酸盐缓冲溶液中溶解和配制产物,调节pH至6-8。出于张力调节目的的赋形剂的添加,
- [0053] • 产品无菌灌装入小瓶或注射器中或冷冻干燥于其中。
- [0054] 在一个方面,以氧化、水解解聚和还原的顺序进行所述方法,更特别地所述方法包含以下步骤:
- [0055] a) 通过用高碘酸盐处理,氧化葡糖醛酸和艾杜糖醛酸,
- [0056] b) 消除或最小化氧化含碘化合物的影响,
- [0057] c) 碱性条件下多糖链的解聚(β 消除过程),和
- [0058] d) 通过与还原剂,如硼氢化钠的反应还原和稳定末端醛基。
- [0059] 在另一个方面,所述方法还包含一个或多个以下步骤:
- [0060] e) 通过除去硼酸盐(氧化硼氢化钠),去除小葡糖胺聚糖片段,加入反离子的方法最终纯化产物并分离到固体形式的产物。
- [0061] f) 真空和加热下干燥产物,或冷冻干燥程序干燥产物以长期储存产物
- [0062] g) 在水性磷酸盐缓冲溶液中溶解和配制产物,调节pH至6-8。出于张力调节目的的赋形剂的添加,
- [0063] h) 产品无菌灌装入小瓶或注射器中或冷冻干燥于其中。

[0064] 在该方法的一个优选的方面,化学修饰的葡糖胺聚糖是未分级肝素和未硫酸化艾杜糖醛酸和/或未硫酸化葡糖醛酸的选择性氧化,从而抑制由ATIII与特定的五糖之间的相互作用介导的抗凝血作用。该氧化分裂具有2个邻位游离羟基的未硫酸化糖醛酸,所述羟基在五糖的C2和C3位负责与AT结合。作为一个非限制性的例子,未分级肝素组分用高碘酸盐如偏高碘酸盐处理,例如将未分级肝素以合适的比例溶解于去离子水和偏高碘酸钠中。如果其他氧化剂对氧化功效和对非硫酸化的残基具有相同的化学影响,而不会影响其它结构或最终产物的稳定性,则可以使用其他氧化剂。

[0065] 根据一个不同的方面,根据本发明的化学修饰的葡糖胺聚糖包含具有下列化学结构的乙二醇分裂残基(式III):



[0067] 乙二醇分裂残基出现在化学修饰的肝素的多糖链,其是氧化和还原处理的结果,如前方法和特定水解步骤的文本中所述。所描绘的乙二醇分裂残基源自未硫酸化的艾杜糖醛酸和葡萄糖醛酸的氧化和还原。

[0068] 为了获得完全氧化,氧化步骤优选在10℃以上的温度下进行,优选在约15±2℃的温度进行,并进行至少15小时,优选为约18-24小时。

[0069] 在实施方案中,高碘酸盐氧化在溶液中进行,其中初始葡糖胺聚糖(例如肝素)浓度为约10-20%w/v,优选约15%w/v。由于在该方法中随后进行的沉淀步骤基于溶剂体积/产物体积,因此,这种高浓度的原料有助于有利的工艺经济。

[0070] 在一个具体实施方式中,通过加入偏高碘酸盐,在约15±2℃的温度下,用约15%

浓度的葡糖胺聚糖(如肝素或硫酸乙酰肝素),和在约5的pH下,进行氧化步骤约18-24小时。

[0071] 在此过程中采用未分级肝素被视为对本发明总体上是有利的,因为它有助于减少材料的浪费,提高成本有效性,和支持提供具有中间多糖链长度和良好的生物利用度的组合物产品。

[0072] 高碘酸盐氧化之后,根据本发明的方法可进一步包含终止氧化和消除剩余的氧化剂中的至少一个步骤。所述至少一个消除步骤包括除去氧化剂的还原形式。在这种情况下,还原形式是指转化为还原形式的氧化剂,有助于在本发明的葡糖胺聚糖中的定向的糖残基的氧化。另外,在这种情况下,还原步骤可以包含添加还原剂,所述还原剂不还原氧化的葡糖胺聚糖而有助于消耗(还原)剩余的氧化剂。

[0073] 因此,本发明一般涉及一种具有选择性氧化未分级葡糖胺聚糖(如肝素或硫酸乙酰肝素)的步骤的方法,该方法使未分级葡糖胺聚糖经受能够氧化非硫酸化糖的氧化剂;消除剩余的氧化剂和氧化剂的还原形式;以及在碱性条件下解聚葡糖胺聚糖链。为了这些目的,消除步骤可以包含加入醇,如水性醇;其量足以使化学修饰的葡糖胺聚糖沉淀。所述醇可以是甲醇、丙醇、乙醇或类似的醇,并允许化学修饰的葡糖胺聚糖沉淀,而氧化剂和其还原形式都用醇除去。可以进行一次沉淀,或重复一次或多次沉淀以优化消除。然而,仅进行一次沉淀可能是有益的,因为它耗时更少,并降低了残余含碘化合物和葡糖胺聚糖之间的暴露时间。

[0074] 消除步骤还可以包括添加能够化学灭活氧化剂的淬灭剂,以进一步发挥对葡糖胺聚糖的氧化效果。可以使用具有两个邻位羟基的任何淬灭剂。合适的淬灭剂的非限制性实例是乙二醇和丙三醇。通过添加含邻位二羟基的淬灭剂,在氧化步骤结束时直接将高碘酸盐转化为危害较小的碘酸盐。

[0075] 本发明人通常认为,所描述的一个或多个消除步骤,有助于抵消或者最小化葡糖胺聚糖的非特异性解聚,即解聚作用不可归因于碱性解聚过程的可预测的结果。如上所提及,非特异性解聚可能导致不可预测的分子量减少、变色制品(具有在储存时增加的吸光度值)、其他的稳定性问题、以及没有预测到的在葡糖胺聚糖,如肝素或低分子量肝素中存在的不明残余物的出现。

[0076] 消除步骤的引入使得能够改善控制任何非特异性解聚。控制非特异性解聚的另一种方法(适用于任何前面描述的方法),是在之前的沉淀步骤过程中,当加入醇时,显著降低温度至低于环境(室温)温度。例如,可以将温度降低至约5℃以防止导致非特异性解聚的不希望反应。

[0077] 作为选择地,所述方法的步骤a)、b)、c)和d)以一个直接序列进行,优选没有任何延迟。在本文中,“直接序列”是指进行所述步骤而没有任何中间沉淀步骤。这对于最小化从氧化步骤的结束至还原步骤的起始所经历的时间是特别重要的。

[0078] 在本发明的一个方面,所述方法的步骤a)、b)、c)和d)以一个直接序列进行,优选没有任何延迟。在本文中,“直接序列”是指进行所述步骤而没有任何中间沉淀步骤。在这个方面,消除或最小化使碘化合物氧化的作用的步骤包含控制对于任何剩余氧化碘化合物的暴露时间,以在选择性氧化步骤的终止和还原步骤的开始之间对于多糖发挥任何不受控制的化学影响。

[0079] 因此,本发明的一个方面是,最小化从氧化步骤的结束至还原步骤的开始所经历

的时间,即从解聚的开始(加碱)至加入硼氢化物的时间。在一个方面,氧化步骤的结束至硼氢化物的加入之间所经历的时间为约1小时至约6小时。在另一个方面,氧化步骤的结束至硼氢化物的加入之间所经历的时间不超过约5小时,优选不超过约4小时,更优选不超过约3小时,并且最优选不超过约2小时。所需的最短时间由反应的pH所控制的解聚的进程来确定。在一个方面,所需的最小时间是约1小时。例如实施例3中所公开的较低的pH值将导致最长需要时间,并且对于较高的pH值反之亦然。可以有利地在同一容器中进行这三个步骤。这种可选的过程具有减少从高碘酸盐氧化结束至还原步骤中其被还原硼氢化物消除之间肝素或硫酸乙酰肝素对于含碘化合物的暴露时间的优点。加入硼氢化物将立即淬灭残余的高碘酸盐并将其转化为其他的产品危害较小的惰性形式,如碘化物和碘。硼氢化物应以有效地淬灭残余的高碘酸盐和还原末端醛基的量来加入。以这种方式压缩反应过程的积极结果展示在表II和III中。

[0080] 氧化剂步骤的终止后,多糖链在碱性条件下解聚。优选在约5-25℃的温度解聚,以获得具有期望的分子量的适当的分级链。解聚合反应的pH在约10-12之间,以保留硫酸化糖醛酸残基的2-O-硫酸根基团(sulfate group)并且防止在增加的pH值下增加产品的黄色着色。后者会影响产品的保质期,因为这是产品的质量/稳定性的指标。该要求用于表征颜色作为产品降解的指标。由于2-O-硫酸化的糖醛酸的脱硫酸化的风险和甚至进一步的产品的着色,pH应优选不到13(0.1N NaOH或更高)。反应时间优选为约15-95分钟,以实现氧化的非硫酸化糖醛酸的充分裂解的适当的反应。

[0081] 随后用还原剂例如硼氢化钠处理被氧化的葡糖胺聚糖,以还原末端醛基。该过程的目的是还原含醛末端端子并将其转化为伯醇,以达到醛不能够通过例如¹³C-NMR分析被检测出的程度。这种还原性末端端子的高度还原有助于产品的高稳定性,因为醛本身是化学上不稳定。另一个消除醛的原因是它们可能具有潜在毒性。其他的还原剂是可以想象的,如果它们能够如硼氢化钠那样进行氧化的葡糖醛酸/艾杜糖醛酸残基的类似的特定还原步骤,而没有不必要的修饰或破坏其它糖类的硫酸根基团。如此还原的链可以被例如通过醇沉淀分离。

[0082] 为了支持选择合意的链,所述方法还可以包括在具有约>3至约12kDa分子量的多糖链中富集肝素或硫酸乙酰肝素衍生物的步骤。富集步骤通常包括常规的沉淀、色谱法、过滤或在生物聚合物的制造中本领域技术人员熟知的分子筛的过程。

[0083] 优化沉淀步骤的参数(产物的浓度,有机溶剂的浓度、pH值和另外的抗衡离子)以保持多糖大于3kDa。

[0084] 我们已经开发出一种最小化非特异性解聚的高收率的新颖方法。在一个方面,同时发生终止氧化反应、除去碘化合物和修饰的肝素或硫酸乙酰肝素的沉淀。这是有利的,因为可能对于产物有害的碘化合物仍溶解于水性乙醇溶液中并由此在沉淀中除去。这与较早的方法例如美国专利4,990,502(其中使用透析或离子交换)相矛盾,该方法是费时。透析是一个繁琐的技术,很少被实践。其必须有综合的卫生设备以防止微生物污染。

[0085] 在本发明的一个方面,所述化学修饰的肝素的多糖链的4至15%具有至少10 kDa的分子质量。

[0086] 在本发明的一个方面,所述化学修饰的肝素的多糖链的10至25%具有至少8kDa的分子质量。

[0087] 在本发明的一个方面,所述化学修饰的肝素的多糖链的22至45%具有至少6kDa的分子质量。

[0088] 在本发明的一个方面,所述化学修饰的肝素的多糖链的70%具有至少3kDa的分子质量。

[0089] 通过进行根据本发明的方法步骤,具有规定的多糖分子量的低抗凝血肝素落于表1所公开的分布中。

[0090] 表1、几个批次的多糖分布及其相应的作为重量累积%的分子质量。

[0091]	分子质量, kDa	累计重量, %
	> 10	4-15
	> 8	10-25
	> 6	22-45
	> 3	> 70

[0092] 重均分子量Mw的对应值落入4.6-6.9kDa的范围。

[0093] 在本发明的一个方面,作为其生产方法步骤的结果,所述化学修饰的葡糖胺聚糖具有低的、控制含量的化学修饰的葡糖胺残基。

[0094] 在本发明的一个方面,所述化学修饰的葡糖胺聚糖包含作为在¹H-NMR波谱中的5.0至6.5之间的信号存在的葡糖胺,所述信号具有相对于来自天然肝素的5.42ppm处的信号4%以下的强度(比例%)。

[0095] 在一个方面,所述来自修饰的葡糖胺的信号存在于¹H-NMR波谱中的6.15ppm和5.95ppm处。

[0096] 在本发明的一个方面,所述葡糖胺聚糖包含总葡糖胺含量的1%以下的修饰的葡糖胺。这种修饰的葡糖胺可位于多糖链的非还原性末端,并且可以在残基结构中包括C4-C5双键。这种修饰的葡糖胺可以在¹H-NMR波谱中的5.95ppm和6.15ppm处产生信号。

[0097] 化学修饰的葡糖胺来自于生产方法步骤过程中对修饰负责的葡萄糖胺残基,并可能导致对于非特异性解聚和葡糖胺聚糖产品的不可预测的特性所讨论的现象。

[0098] 本发明的一个方面,提供一种最小化非特异性解聚和化学修饰的葡糖胺出现的方法,其通过在有助于修饰可能的葡糖胺的方法步骤中控制葡糖胺聚糖对于试剂的暴露而实现。

[0099] 因此,本发明的方法有助于在多糖链上最小化将可能的葡糖胺修饰为不可预知的或未知的残基。从而该方法有助于生成合适的接近肝素或低分子量肝素的产品,他们可能符合目前由EDQM(European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare),欧洲委员会,2012(H-NMR验收标准)制定的对于肝素的验收标准。

[0100] 为此,本发明方法的一个方面包含消除或最小化用于选择性氧化葡糖胺聚糖的氧化剂的作用的步骤。当氧化剂是高碘酸盐化合物时,消除步骤包含除去氧化剂(碘化合物)的还原形式。

[0101] 在一个方面,消除或最小化氧化含碘化合物的效果的步骤可以包含控制在氧化步

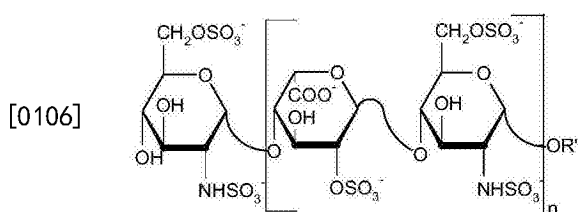
骤的终止与还原步骤的开始之间对于任何氧化剂的暴露时间。

[0102] 如此描述的方法得到具有最佳粒径分布的多糖链的总体富集,以确保产品具有所需的药理学性质,最小化不利的特性,高生物利用度和处理和储存稳定性。因此,该方法涉及到保证完全氧化的条件,并得到具有有利的粒径分布的链,有利的粒径分布支持理想的治疗效果,并且被认为相对于其他描述的低抗凝血肝素(LAH)提高了治疗指数。本发明通常扩展到用所述方法制备的葡糖胺聚糖衍生物。

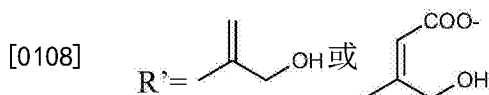
[0103] 在另一个方面,本发明涉及化学修饰的肝素或硫酸乙酰肝素,其具有10IU/mg以下的抗因子IIa活性,小于10IU/mg以下的抗因子Xa活性,和约4.6至约6.9kDa的平均分子量(Mw)。这样的衍生物能够用本发明的方法制备。所述根据本发明的化学修饰的肝素或硫酸乙酰肝素进一步的特征在于:

[0104] -对应于1.2至12kDa之间的分子量,多糖链具有2至20(式I中的n)个二糖单元;

[0105] -主要出现的二糖为(式I)



[0107] 其中



[0109] n是2至20的整数

[0110] 主要的二糖具有约600Da的分子量。在这种情况下,术语“主要”具有“最经常出现”的多糖链的含义。

[0111] 此外,在根据如上所公开的方法修饰的葡糖胺聚糖中,多糖链保留对应的天然葡糖胺聚糖的至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、甚至更优选基本上全部的硫酸根基团。另一个特征在于,当与对应的天然葡糖胺聚糖链相比时,多糖链基本上缺少调节抗凝血作用的化学上完整的五糖序列。

[0112] 此外,在根据本发明的修饰的葡糖胺聚糖中,主要的大小是对应于3.6-7.2kDa的分子量的6-12个二糖单元。在这种情况下,术语“主要的”具有“最经常出现”的多糖链的含义。

[0113] 在本发明的一个方面,所述化学修饰的葡糖胺聚糖基本上不含完整的非硫酸化艾杜糖醛酸和/或葡萄糖醛酸。在这种情况下,“基本上不含”是指¹³C-NMR波谱中不可检测到。典型地,检测限设定为0.1%。

[0114] 还优选,所述修饰的葡糖胺聚糖衍生自肝素并且所述链基本上不含非硫酸化艾杜糖醛酸和/或非硫酸化葡萄糖醛酸,优选基本上不含D-葡萄糖醛酸,当与对应的天然肝素的链相比时,所述链导致调节抗凝血作用的化学完整的五糖的删除。

[0115] 进一步优选,所述化学修饰的葡糖胺聚糖包含具有如图1所示的还原性末端端子代替物R'的链。非还原性端子主要是G1cN,硫酸化葡糖胺。

[0116] 还优选,所述化学修饰的葡糖胺聚糖具有至少70%的分子量在3kDa以上的多糖

链。5%以下,优选3%以下,更优选1%以下的多糖链具有15kDa以上的分子量也是合适的。

[0117] 优选地,本发明的化学修饰的硫酸化肝素作为磷酸缓冲水溶液,于5℃,具有至少36个月稳定的平均分子量,优选至少48个月,更优选至少60个月。当作为粉末,于25℃的温度,储存至少5年时,该平均分子量仍然是稳定的。关于稳定性特征的更详细的内容见于实施例2。

[0118] 本发明还涉及用如上所公开的方法制备的化学修饰的葡糖胺聚糖。

[0119] 本发明进一步涉及药物组合物,其用于治疗所提及的并发症和优选的治疗实施方案,其含有治疗有效量的所描述的化学修饰的葡糖胺聚糖和治疗学上可接受的载体。所述组合物可以通过胃肠外施用而系统地施用,例如通过皮下或静脉内注射。所述药物组合物还可以通过口服施用。对于胃肠外施用,活性化合物可以合并入溶液剂或混悬剂,所述溶液剂或混悬剂还含有一种或多种佐剂,例如无菌稀释剂如注射用水、生理盐水、固定油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其它合成溶剂、抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、缓冲剂和调节渗透度的试剂。可以在安瓶、小瓶、一次性注射器中或作为输液装置递送胃肠外制剂,还可以用于自身给药。

[0120] 根据本发明的修饰的葡糖胺聚糖很好地适用于皮下施用并因此使用合适的自身给药工具,例如注射器,因为它们具有有利于从皮下储存器再吸收的分子量分布,并且以这样的方式类似于商业可得的低分子量肝素。

[0121] 此外,由于有利的分子量分布,根据本发明的修饰的葡糖胺聚糖很好地适合于局部施用,包括粘膜渗透,例如但不限于,阴道内的、直肠的、子宫内的和鼻内的施用。

[0122] 本发明还涉及如上所描述的化学修饰的葡糖胺聚糖,其用于不依赖于抗凝血作用的医药治疗。

[0123] 本发明进一步涉及根据本发明的化学修饰的葡糖胺聚糖在制备用于不依赖于抗凝血作用的医药治疗的药物中的用途。

[0124] 这样的医药治疗的非限定性实例是预防和治疗滞产(难产)和蛋白漏出例如Gorham Stout综合征。从内皮或上皮层的蛋白漏出也在如脓毒病和蛋白丢失性肠病的障碍中出现。以治疗有效量将根据本发明的化学修饰的葡糖胺聚糖施用给患者。

[0125] LMWH及低抗凝血肝素体外和体内增加晚期孕妇中催产素诱发的子宫肌层的收缩性。向来自阴道分娩的人类宫颈活检取样的宫颈细胞培养中添加根据本发明的LMWH或低抗凝血肝素增加了白介素-6和-8的合成。该发现支持了LMWH和低抗凝血肝素诱发宫颈成熟。因此,LMWH和低抗凝血肝素具有使子宫颈发炎的作用,这与其在其它器官中被证明的抗炎作用相反。因此,根据本发明的化学修饰的GAG可以用于预防和治疗滞产。

[0126] 已经假设向患者施用低抗凝血肝素降低蛋白质穿过细胞屏障的能力,由此治疗或预防内皮或上皮层的蛋白漏出。进一步假设如上所定义的低抗凝血肝素与如细胞因子和生长因子(例如VEGF)的因子结合,由此调节这些因子的活性。其它这样的因子为肝素结合蛋白(HBP,天青杀素),其涉及到内皮漏出中并且最近被提示为早期脓血症的主要标记物。鉴于HBP似乎涉及到例如Gorham Stout综合征的病理学血管生成过程和渗漏血管的病症(HBP),并且失去硫酸化乙酰肝素能够导致整个肠上皮的蛋白质漏出这一事实,假设给予根据本发明的低抗凝血肝素与更常规的治疗方法联合将是有利的并且肝素将降低所述过程(Acta Paediatrica 2011 100, pp.1448-1453)。

[0127] 总之,根据本发明的化学修饰的葡糖胺聚糖的体内效果来自合适的分子量分布和强的多阴离子特性的组合。已经根据GMP优化、筛选和产生了本发明方法,其允许将产品施用于人。

[0128] 现在,在以下非限定性的实施例中进一步描述本发明。

[0129] 实施例

[0130] 根据本发明的化学修饰的肝素的生产过程的详细描述

[0131] 从肝素钠制备物质。所述制备涉及用高碘酸盐选择性氧化在肝素中的非硫酸化的糖醛酸残基,包括结合于AT的五糖序列中的葡萄糖醛酸部分。破坏该残基的结构毁坏了与AT的高亲合性相互作用,并且因此基本上消除抗凝血作用(以 α -FXa或 α -FIIa测定)。随后的碱处理, β 消除反应导致聚合物在已经被高碘酸盐氧化的非硫酸化糖醛酸位点上裂解。同时,这些操作处理导致抗凝血活性的丧失和肝素链的充分解聚。

[0132] 另外,用 NaBH_4 还原所得到的裂解位点处的还原末端端子, NaBH_4 将末端醛转化为相应的更稳定的二醇。然后,通过用乙醇的反复沉淀、过滤和离心除去添加剂、杂质和副产物。然后通过真空干燥和加热获得粉末形式的物质。将药物物质溶解于无菌水性缓冲液中以得到药物产品,其旨在用于静脉内或皮下施用。

[0133] 目前为止描述的过程通常包括氧化、聚合物裂解(碱水解)和还原步骤。开发根据本发明过程以抵消或消除肝素链的任何类型的非特异性解聚。在这种情况下,非特异性解聚通常指与特定的碱性 β 消除反应无关的解聚。非特异性解聚导致产物的结构不稳定,其可能产生纯化的产品在储存期间进一步的解聚和变色。另外,其可能有助于平常在肝素中没有发现的,在NMR波谱中出现的,非典型物种的出现。

[0134] 在以下段落中描述和列举的方法包括抵消或消除非特异性解聚的不同方面。

[0135] 实施例1

[0136] 非硫酸化葡萄糖醛酸和艾杜糖醛酸(残基)的氧化,结合AT的五糖和抗凝血活性的删除

[0137] 将约3000克肝素溶解于净化水中以得到10-20%w/v的溶液。将该溶液的pH调节至4.5-5.5。然后,将偏高碘酸钠(NaIO_4)加入到生产溶液中;高碘酸盐的量为肝素重量的15-25%。再次将pH调节至4.5-5.5。避光进行反应。在保持13-17°C的温度下,在连续搅拌下,使生产溶液反应18-24小时,其中在最后的两个小时中将温度降至5°C。

[0138] 氧化反应的终止和含碘化合物的除去

[0139] 于5-25°C的温度,伴随着温和的搅拌,将乙醇(95-99.5%)经0.5-1小时添加入反应混合物中。添加的乙醇的体积在1-2体积乙醇/生产溶液体积的范围内。然后使氧化的肝素沉淀并沉积15-20小时,然后倾倒入并弃除母液。

[0140] 然后,将沉积物溶解于净化水中以获得15-30%w/v生产溶液。加入 NaCl 以获得生产溶液中0.15-0.30mol/l的浓度。在保持5-25°C的温度同时继续搅拌另外的0.5-1小时。然后在搅拌下,将1.0-2.0体积乙醇(95-99.5%)/生产溶液体积经0.5-1小时加入到该溶液中。从该溶液中沉淀出产物。

[0141] 通过碱性 β 消除过程的多糖链的解聚

[0142] 倾倒入并弃除母液后,将沉积物于约7升的水中搅拌直至完全溶解,溶液的浓度现在为15-30%。在保持5-25°C的温度同时缓慢加入4M NaOH 溶液直至获得10.5-12的pH。引发

并进行反应15-95分钟。此时,记录溶液的pH并缓慢添加4M HCl直至获得5.5-7的pH。

[0143] 还原性末端端子的还原

[0144] 在保持13-17℃的温度同时,将溶液的pH调节至5.5-6.5。然后将130-150克硼氢化钠加入至溶液中,此时pH将升至10-11,继续反应14-20小时。这段反应时间后,缓慢加入稀酸以调节pH值至4,这降解剩余的硼氢化钠。维持4的pH值45-60分钟后,使用稀的NaOH溶液将溶液的pH调节至7。

[0145] 根据实施例5继续纯化。

[0146] 实施例2

[0147] 葡萄糖醛酸和艾杜糖醛酸(残基)的氧化,抗凝血活性的删除

[0148] 将约3000克肝素溶解于净化水中以得到10-20%w/v的溶液。将该溶液的pH 调节至4.5-5.5。然后,将偏高碘酸钠(NaIO_4) 加入到生产溶液中;高碘酸盐的量为肝素重量的15-25%。再次将pH调节至4.5-5.5。避光进行反应。在保持13-17℃的温度下,在连续搅拌下,使生产溶液反应22-26小时,其中在最后的两个小时中将温度降至5℃。反应期结束时测定并记录pH。

[0149] 氧化反应的终止和含碘化合物的除去

[0150] 于5-25℃的温度,伴随着温和的搅拌,将乙醇(95-99.5%)经0.5-1小时添加入反应混合物中。添加的乙醇的体积在1-2体积乙醇/生产溶液体积的范围内。然后使氧化的肝素沉淀并沉积15-20小时,然后倾倒入并弃除母液。

[0151] 通过碱性β消除过程的多糖链的解聚

[0152] 倾倒入并弃除母液后,将沉积物于约7升的水中搅拌直至其外表显示完全溶解。在保持20-25℃的温度同时缓慢加入4M NaOH溶液直至获得10.5-12的pH,因此允许引发的反应进行15-95分钟。此时,记录溶液的pH并缓慢添加4M HCl直至获得5.5-7的pH。

[0153] 还原性末端端子的还原

[0154] 倾倒入并弃除母液后,通过添加净化水溶解沉积物直至获得15-30%w/v的生产溶液浓度。在保持13-17℃的温度同时,将溶液的pH调节至5.5-6.5。然后将130-150克硼氢化钠加入至溶液中并使其溶解,pH立即升至pH10-11,继续反应14-20小时。记录该反应时间段之前和之后的溶液的pH。这段反应时间后,缓慢加入稀酸以调节pH值至4,这降解剩余的硼氢化钠。维持4的pH值45-60分钟后,使用稀的NaOH溶液将溶液的pH调节至7。

[0155] 根据实施例5继续纯化。

[0156] 实施例3

[0157] 葡萄糖醛酸和艾杜糖醛酸(残基)的氧化,抗凝血活性的删除

[0158] 将约3000克肝素溶解于净化水中以得到10-20%w/v的溶液。将该溶液的pH调节至4.5-5.5。然后,将偏高碘酸钠(NaIO_4) 加入到生产溶液中;高碘酸盐的量为肝素重量的15-25%。再次将pH调节至4.5-5.5。避光进行反应。在保持13-17℃的温度下,在连续搅拌下,使生产溶液反应18-24小时,其中在最后的两个小时中将温度降至5℃。

[0159] 通过碱性β消除过程的多糖链的解聚

[0160] 在保持5-25℃的温度同时,缓慢加入4M NaOH溶液直至获得10.5-12的pH。引发并进行反应15-95分钟。此时,记录溶液的pH并缓慢添加4M HCl直至获得5.5-7的pH。

[0161] 还原性末端端子的还原

[0162] 在保持13-17℃的温度同时,将溶液的pH调节至5.5-6.5。然后将130-200克硼氢化钠加入至溶液中,此时pH升至10-11,继续反应14-20小时。这段反应时间后,缓慢加入稀酸以调节pH值至4,这降解剩余的硼氢化钠。维持4的pH值 45-60分钟后,使用稀的NaOH溶液将溶液的pH调节至7。

[0163] 还原的产物的沉淀和含碘化合物的初始去除

[0164] 于5-25℃的温度,在温和搅拌下,将乙醇(95-99.5%)经过0.5-1小时加入反应混合物中。添加的乙醇的体积在1-2体积乙醇/生产溶液体积的范围内。然后使得氧化的肝素沉淀并沉积15-20小时,然后倾倒入并弃除母液。

[0165] 然后,将沉积物溶解于净化水中以获得15-30%w/v的生产溶液。加入NaCl以获得生产溶液中0.15-0.30mol/升的浓度。

[0166] 根据实施例5继续纯化。

[0167] 实施例4

[0168] 葡萄糖醛酸和艾杜糖醛酸(残基)的氧化,抗凝血活性的删除

[0169] 将约3000克肝素溶解于净化水中以得到10-20%w/v的溶液。将该溶液的pH调节至4.5-5.5。然后,将偏高碘酸钠(NaIO_4)加入到生产溶液中;高碘酸盐的量为肝素重量的15-25%。再次将pH调节至4.5-5.5。反应器避光。在保持13-17℃的温度下,在连续搅拌下,使生产溶液反应18-24小时,其中在最后的两个小时中将温度降至5℃。然后,加入丙三醇以淬灭反应,即将残余高碘酸盐转化为碘酸盐,加入150-200ml 85%的丙三醇溶液并搅拌下反应30-60分钟。

[0170] 沉淀产物,除去含碘化合物和淬灭/反应产物

[0171] 于5-25℃的温度,在温和搅拌下,将乙醇(95-99.5%)经过0.5-1小时加入反应混合物中。添加的乙醇的体积在1-2体积乙醇/生产溶液体积的范围内。然后使得氧化的肝素沉淀并沉积15-20小时,然后倾倒入并弃除母液。

[0172] 然后,将沉积物溶解于净化水中以获得15-30%w/v的生产溶液。加入NaCl以获得生产溶液中0.15-0.30mol/升的浓度。在保持5-25℃的温度同时继续搅拌0.5-1小时。然后,搅拌下,经0.5-1小时,向该溶液加入1.0-2.0体积乙醇(95-99.5%)/生产溶液体积。从该溶液中沉淀出产物。

[0173] 通过碱性β消除过程的多糖链的解聚

[0174] 倾倒入并弃除母液后,在约7升的水中搅拌沉积物直至其外观显示完全溶解。在保持5-25℃的温度同时,缓慢加入4M NaOH溶液直至获得10.5-12的pH,允许由此引发的反应进行60-95分钟。此时,记录溶液的pH并缓慢添加4M HCl直至获得5.5-7的pH。

[0175] 还原性末端端子的还原

[0176] 倾倒入并弃除母液后,通过添加净化水溶解沉积物直至获得15-30%的生产溶液浓度。在保持13-17℃的温度同时,将溶液的pH调节至5.5-6.5。然后将130-150克硼氢化钠加入至溶液中并使其溶解,pH立即升至pH10-11,继续反应14-20小时。记录该反应时间段之前和之后的pH。这段反应时间后,缓慢加入稀酸以调节pH值至4,这降解剩余的硼氢化钠。维持4的pH值45-60分钟后,使用稀的NaOH溶液将溶液的pH调节至7。

[0177] 根据实施例5继续纯化。

[0178] 实施例5

[0179] 产物的纯化

[0180] 过程添加剂和杂质的去除,反离子的添加和过滤

[0181] 根据如下概括的方法处理来自自由硼氢化物还原末端端子的最终化学修饰步骤的根据实施例1-4的生产溶液。

[0182] 然后,将一体积的生产溶液添加入1.5-2.5体积的乙醇(95-99.5%),然后于<20℃,于>2000G离心20-30分钟,随后倾倒入并弃除上清液。

[0183] 然后将离心获得的产物糊状物溶解于净化水中以获得10-20%w/v的产物浓度。然后加入NaCl以获得0.20-0.35mol/升的浓度。然后,每体积生产溶液添加1.5-2.5体积的乙醇(95-99.5%),其从溶液中沉淀出产物。如上所述离心。

[0184] 然后,向剩余的糊状物中添加净化水以溶解。现在的产物浓度在10-20%w/v的范围内。将产物溶液的pH调节至6.5-7.5。然后过滤溶液以除去任何微粒。然后,向一体积的生产溶液中添加1.5-2.5体积的乙醇(95-99.5%)。然后于<20℃,于>2000G,进行离心20-30分钟,然后倾倒入并弃除上清液。

[0185] 沉淀糊状物的脱水和粒径的降低

[0186] 向反应器中填充入乙醇约2升体积。在搅拌乙醇下,同时加入沉淀糊状物。机械搅拌固化糊状物并用乙醇替换存在的水得到同质颗粒混悬液。1-2小时后停止搅拌,然后使颗粒沉积。移除过量的液体后,使颗粒过筛或研磨以获得较小的且均匀大小的颗粒。

[0187] 产物的干燥

[0188] 将产物均匀地分布于托盘上,并置于真空箱中。施用真空并于35-40℃进行加热。此时,在保持干燥器内低压同时,氮气蒸汽通过干燥器。当产物获得稳定的重量时,即没有发现进一步的蒸发,视为完成干燥。包装产品并防湿保存。

[0189] 实施例6

[0190] 葡萄糖醛酸和艾杜糖醛酸(残基)的氧化,抗凝血活性的删除

[0191] 将约3000克肝素溶解于净化水中以得到10-20%w/v的溶液。将该溶液的pH调节至4.5-5.5。然后,将偏高碘酸钠(NaIO_4)加入到生产溶液中;高碘酸盐的量为肝素重量的15-25%。再次将pH调节至4.5-5.5。避光进行反应。在保持13-17℃的温度下,在连续搅拌下,使生产溶液反应18-24小时,其中在最后的两个小时中将温度降至5℃。

[0192] 通过碱性 β 消除过程的多糖链的解聚

[0193] 在保持5-25℃的温度同时,缓慢加入4M NaOH溶液直至获得10.5-12的pH,允许由此引发的反应进行15-95分钟。此时,记录溶液的pH并缓慢添加4M HCl直至获得5.5-7的pH。

[0194] 还原性末端端子的还原

[0195] 倾倒入并弃除母液后,通过添加净化水溶解沉积物直至获得15-30%w/v的生产溶液浓度。在保持13-17℃的温度同时,将溶液的pH调节至5.5-6.5。然后将130-200克硼氢化钠加入至溶液中并使其溶解,pH立即升至pH10-11,继续反应14-20小时。记录该反应时间段之前和之后的pH。这段反应时间后,缓慢加入稀酸以调节pH值至4,这降解剩余的硼氢化钠。维持4的pH值45-60分钟后,使用稀的NaOH溶液将溶液的pH调节至7。然后向溶液中加入净化水直至获得15-20mS/cm的反应溶液导电性。

[0196] 通过离子交换色谱法纯化产物

[0197] 将直径500mm的色谱柱用介质、DEAE-Sepharose或QAE-Sepharose填装至对应于

10-15cm床高的25-30升体积。进行色谱法3-4轮以消耗所有的产物。

[0198] 然后制备缓冲液,

[0199] 平衡缓冲液,缓冲液A,15mM磷酸盐,150mM NaCl

[0200] 洗脱缓冲液,缓冲液B,2M NaCl溶液

[0201] 装备缓冲液,0.5M NaOH

[0202] 于15-25℃,以 ≤ 200 cm/小时或约350升/小时的流速,进行该色谱法步骤。

[0203] 将柱用平衡缓冲液平衡直至洗脱液具有15-20mS/cm的导电性。然后将氧化肝素溶液泵入柱内。施加的粗产物的量相当于 < 40 g/升的色谱法介质。

[0204] 平衡缓冲液后进行等度(isocratic)冲洗,并当UV210-254nm达到基线时停止冲洗。典型地,需要5床体积的缓冲液来达到基线。除去添加入过程中的化学品和这些化学品形成的产物。

[0205] 然后,通过进行梯度洗脱,应用于柱上的缓冲液的离子强度线性增加。缓冲液A从100%降至0%,而被超过5床体积的100%缓冲液B替换。当UV吸收为 > 0.1 AU时收集产物(洗脱物),并且当信号 < 0.1 AU时停止收集。然后进行柱的保洁,随后再次准备色谱柱以用于下一轮色谱法。合并所有轮次的洗脱物并保存于15-25℃。

[0206] 产物的脱盐

[0207] 于15-25℃,连续搅拌下,向一体积上述步骤中获得的合并的洗脱物添加3体积的95-99.5%乙醇。从该溶液中沉淀出产物。允许产物沉积 > 3 小时。然后,将沉积物溶解于净化水中达到15-25%的浓度。然后将溶液添加入95-99.5%的冷乙醇($< -5^{\circ}\text{C}$),典型地消耗5体积乙醇/一体积产物溶液。然后,于 > 2000 G,以连续模式离心,然后收集并制得产物糊状物以干燥。

[0208] 产物的干燥

[0209] 将产物均匀地分布于托盘上,并置于真空箱中。应用真空并于35-40℃进行加热。此时,在保持干燥器内低压同时,氮气蒸汽通过干燥器。当产物获得稳定的重量时,即没有发现进一步的蒸发,视为完成干燥。粉碎产物并得到同质性,然后包装产品并防湿保存。

[0210] 实施例8

[0211] 使根据实施例1和3制备的低抗凝血肝素经历 $^1\text{H-NMR}$ 分析与天然肝素的波谱比较。

[0212] 表II阐明了产生于非还原性末端不饱和葡糖胺的5.00ppm至6.50ppm之间的信号不存在于天然肝素中。表II的结果显示能够从天然肝素降低这样的不被预测存在于波谱中的化合物的存在至一个很低的水平。作为对比,对于5.70-8.00ppm区域内的任何信号,目前适用于肝素质量控制的限制(EDQM的专题7)为与5.42ppm的信号相比 $< 4\%$ 。

[0213] 表II、关于异常信号的低抗凝血肝素的定量结果。 $^1\text{H-NMR}$ 波谱中信号6.15和5.95ppm的信号强度

[0214]

样品	制备方法	根据 EDQM 的专题 7 的相对于天然肝素 5.42 ppm 信号的强度 (比例%)	
		6.15ppm 参照信号的%	5.95ppm 参照信号的%
批次 1	实施例 1	11	12
批次 2	实施例 1	13	16
批次 3	实施例 3	2	2

另外,通过合并¹H-NMR和¹³C-NMR波谱评估(HSQC)还定量了非还原性末端不饱和葡萄糖胺的存在,并以mol%的总葡萄糖胺证明(表III)。

[0215] 另外,通过以下的NMR二维(2D)方法分析样品,所述NMR二维方法涉及如前所述的质子和碳NMR波谱(HSQC)的联合应用(参见Guerrini M.,Naggi A.,Guglieri S.,Santarsiero R,Torri G.Anal Biochem2005;337,35-47)。

[0216] 表III阐明了与低抗凝血肝素的葡萄糖胺的总量相比的修饰的葡萄糖胺的部分(%),其以¹H-NMR波谱中的5.95ppm和6.15ppm处的信号存在。

[0217] 表III:总葡萄糖胺的异常信号5.95ppm、6.15ppm的定量测定结果

[0218]

样品	制备方法	6.15ppm 信号 葡萄糖胺的 mol%	5.95ppm 信号 葡萄糖胺的 mol%
批次 1	实施例 1	6	3
批次 2	实施例 3	<1	<1

[0219] 实施例9

[0220] 可以通过常规的无菌工艺将根据上述任何一个实施例生产的产品制成药物产品,例如pH6-8的含有150mg/mL的活性产物和15mM磷酸钠的溶液。如此获得的药物产品主要旨在用于皮下施用,但也适用于静脉内施用。

[0221] 得到的产品是具有设计的4.6-6.9kDa平均分子量并基本上没有抗凝血活性的肝素的解聚形式。

[0222] 所述产品具有对应于1.2-15kDa的分子量n为2-20范围内的多糖聚合物的粒径分布。主要的大小是对应于3.6-9.6kDa分子量的6-16个二糖单元。

[0223] 通过用TSK2000和TSK3000SW串联柱进行的GPC-HPLC测定分子量。使用折射率来评估。对于LMWH使用第一国际校准物。

[0224] 下面呈现分子质量分布和总重量累积百分比的相应部分。

[0225] 表IV、几个批次的多糖的分布及以重量累积%表示的其对应的分子质量

[0226]

分子质量, kDa	累积重量, %
>15	<1
>10	4-15
>9	7-20
>8	10-27
>7	15-35
>6	22-45
>5	34-56
>4	47-70
>3	>70
>2	>85

重均平均分子量的相应值, M_w 落入 4.6–6.9 kDa 的范围内。

[0227] 实施例10

[0228] 研究了根据本发明方法制备的化学修饰的GAG的药物物质(粉末)和溶解于磷酸盐水性缓冲溶液中的药物产品的稳定性。结果公开于图2和图3。

[0229] 实施例11

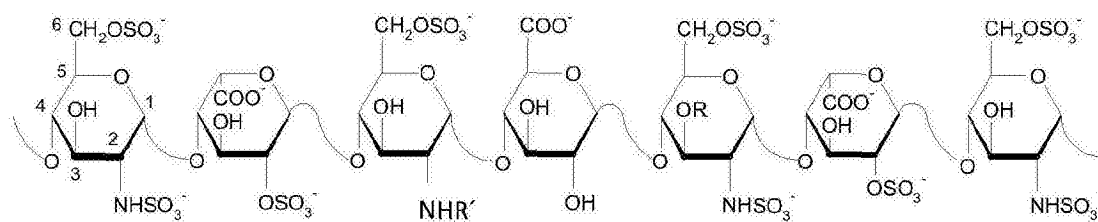
[0230] 皮下施用

[0231] 向斯普拉-道来氏 (Sprague Dawley) 大鼠和狗施用通过实施例1公开的方法制备的氘标记的化学修饰的肝素。

[0232] 结果:

[0233] 对于大鼠以 2、8 和 24 mg 肝素/kg/天以及对于狗以 3、15 和 45 mg 肝素/kg/天皮下施用后, 迅速吸收并且通常在大鼠和狗中分别在 0.5 和 1.5 小时内达到最大血浆浓度。在大鼠和狗中皮下生物利用度约为 90%。令人感兴趣的是, 肝素的相应的生物利用度约为 10%。

[0234] 尽管本文详细描述了特别的实施方案, 其是以实施例的形式完成的, 仅用于阐述目的, 并且其并不意味着限制了附上的权利要求的范围。特别地, 发明人预期本发明可以作出各种替换、变化、和修饰而不偏离由权利要求书所限定的本发明的精神和范围。



GlcN - UA - GlcN - UA - GlcN - UA - GlcN

R = -H 或 $-\text{SO}_3^-$

R' = COCH_3 或 $-\text{SO}_3^-$

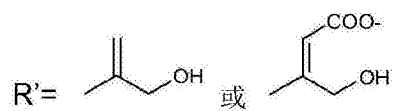
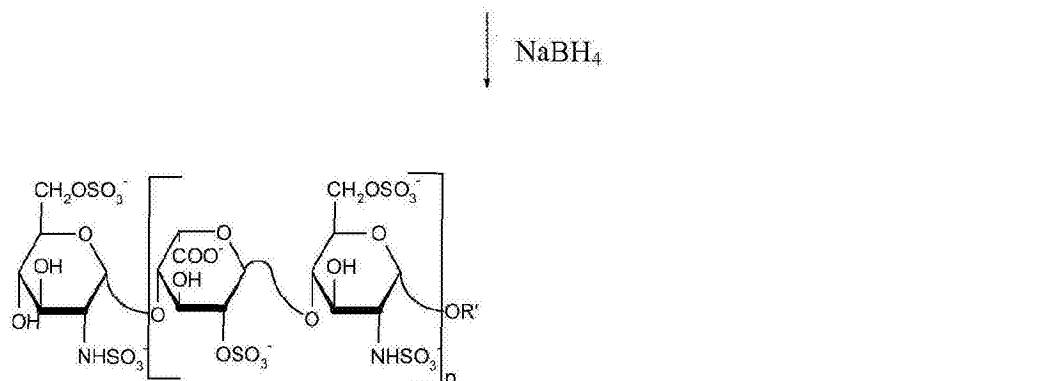
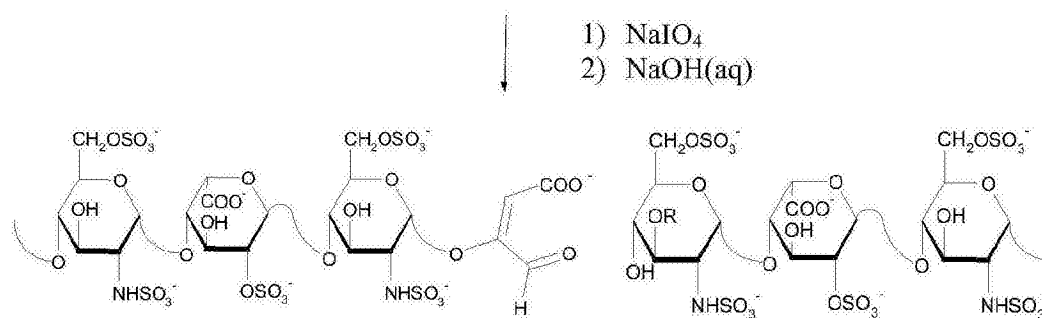


图1

药物物质经60个月的稳定性结果。基于所选择的稳定性指示参数。

测试		目测外观	10%溶液的颜色吸光度, 400nm	平均分子量 Mw, kDa	pH
储存条件:					
温度(°C) /% RH	时间 (月)				
25/60	初始	白色至淡黄色粉末	0.09	5.58.8	
	3	符合规定	0.10	5.7	8.9
	6	符合规定	0.11	5.5	8.6
	12	符合规定	0.10	5.5	8.8
	18	符合规定	0.10	5.5	8.4
	24	符合规定	0.10	5.5	8.7
	36	符合规定	0.11	5.5	8.4
	48	符合规定	0.12	5.5	8.1
	60	符合规定	0.11	5.5	8.3

图2

药物产品经36个月的稳定性结果，基于所选择的稳定性指示参数。

测试	外观	10% w/v 溶液400nm 处的颜色吸光度	pH	渗透度 mOsm/kg	平均分子量 MkDa	分析	
						含量 mg/mL	
储存条件:							
温度 [°C] /% RH	时间 [月]						
	初始	不含肉眼可见 的颗粒的透明白 色至淡黄色溶液	0.14	7.0	658	5.6	150
5/环境温度	1	符合规定	0.10	7.0	658	5.4	155
	3	符合规定	0.11	7.0	-	5.4	-
	6	符合规定	0.12	7.1	637	5.5	147
	9	符合规定	0.12	7.1	-	5.5	-
	12	符合规定	0.13	7.0	648	5.5	156
	18	符合规定	0.12	7.1	660	5.4	-
	24	符合规定	0.12	7.1	658	5.4	152
	36	符合规定	0.13	7.1	657	5.4	153

图3