



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.[®]: *C 08 B 37/10 (2006.01)*

(21) Patentansøgning nr: PA 1991 01243

(22) Indleveringsdag: 1991-06-25

(24) Løbedag: 1991-06-25

(41) Alm. tilgængelig: 1991-12-27

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2008-07-14

(30) Prioritet: 1990-06-26 FR 9008013

(73) Patenthaver: Aventis Pharma S.A., 20, Avenue Raymond Aron, F-92160 Antony, Frankrig

(72) Opfinder: Roger Debrie, 73, rue de la Liberation, Brenouille, 60870 Rieux, Frankrig

(74) Fuldmægtig: Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark

(54) Benævnelse: Blandinger af sulfaterede polysaccharider samt fremstilling og anvendelse deraf

(56) Fremdragne publikationer:

(57) Sammendrag:

Opfindelsen angår blandinger af sulfaterede polysaccharider, som har lavere gennemsnitsmolekylvægt end heparin, som indeholder mellem 9 og 20% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton og mellem 5 og 20% kæder med en molekylvægt på over 9000 dalton, og hvori forholdet mellem gennemsnitsmolekylvægten efter vægt og gennemsnitsmolekylvægten efter antal er mellem 1,3 og 1,6.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af disse blandinger samt anvendelse af blandingerne.

BLANDINGER AF SULFATEREDE POLYSACCHARIDER SAMT FREMSTILLING OG ANVENDELSE DERAFT.

Den foreliggende opfindelse angår polysaccharider med lav molekylvægt, især hepariner med lav molekylvægt.

Hepariner er biologiske stoffer udvundet ved ekstraktion, som hører til familien af glycosaminoglycaner, og de er anvendelige på grund af deres antikoagulerende og antithrombotiske virkninger. De anvendes især ved behandling af venethromboser efter operationer. I nativ form har hepariner imidlertid visse ulemper, som begrænser deres anvendelse. Således kan den antikoagulerende virkning fremkalde blødninger, og følsomheden over for visse serumfaktorer, såsom pf4, nødvendiggør anvendelse af relativt høje doser. Det er altså nødvendigt at forøge den antithrombotiske virkning, som især tilskrives antiprothrombinase, på bekostning af den antikoagulerende virkning, som tilskrives antithrombinvirkning.

Til dette formål er der blevet foreslået fragmentering af hepariner til molekyler med lavere molekylvægte. I EP patentskrift nr. 40.144 beskrives således blandinger af sulfaterede polysaccharider med samme generelle struktur som de polysaccharider, der indgår i heparin, idet disse polysaccharider indeholder en ethylenisk dobbeltbinding ved en af kædeenderne og har en gennemsnitsmolekylvægt efter vægt på mellem 2000 og 10.000 dalton. Disse blandinger fås ved depolymerisation og forsæbning af en heparinester. Det er anført, at blandingerne har en høj antithrombotisk virkning og en total antikoagulerende virkning, som er lavere end virkningen af heparin.

Et af hovedproblemerne med hepariner er, at de er meget heterogene produkter. Det er altså svært at vurdere det bidrag, som hver heparintype giver til heparinproduktets virkning, det er svært at bestemme heparintypernes opførsel under depolymerisationen, og det er svært at kontrollere heparintypernes struktur og egenskaber i slutprodukterne. Af disse grunde har de ovenfor nævnte problemer ikke kunnet løses på en fuldstændig tilfredsstillende må-

de. De ovenfor beskrevne fremgangsmåder, især fremgangsmåden beskrevet i EP patentskrift nr. 40.144, gør det ikke muligt at få blandinger med ønskede farmakologiske egenskaber, dvs. en tilstrækkeligt høj halveringstid i plasma, en tilstrækkeligt høj absorptions hastighed, en god biologisk tilgængelighed og en lav "clearance".

Der er også blevet beskrevet andre fremgangsmåder til fragmentering af heparin med henblik på at formindske de uønskede virkninger (Johnson et al., Thrombos. Haemostas. Stuttg., 1976, 35, 586; Lane et al., Thrombosis Research 16, 651; US patentskrift nr. 3.766.167). Alle disse publikationer synes at vise, at den ønskede virkning fremmes, når heparinets fragmenteringsgrad forøges (se også EP patentpublikation nr. 301.618, som beskriver pentasaccharider med antithrombotisk virkning).

Nyligt gennemførte undersøgelser af hepariners virkningsmekanisme ved dannelse af thrombin har vist, at hepariners virkning in vitro påvirkes af gennemsnitsmolekylvægten (Beguín et al., Thromb. Haemost., 61, 30, 1989). Forfatterne angiver, at hepariner med lav molekylvægt fremfor alt har en antiprothrombinase-virkning, og at hepariner med højere molekylvægt har en antithrombin-virkning.

Det er også blevet foreslået at fraktionere hepariner til udvinding af blandinger med mere homogen gennemsnitsmolekylvægt. I EP patentpublikation nr. 337.327 beskrives således en fremgangsmåde til fremstilling af oligosaccharidfragmenter afledt af heparin, og denne fremgangsmåde muliggør fremstilling af blandinger med formindsket molekylvægtspredning. Ifølge denne fremgangsmåde fjernes først fraktioner med en gennemsnitsmolekylvægt på under 3000 dalton, hvilket medfører, at fragmenter indeholdende mindre end 10-16 saccharider fjernes fra slutproduktet, og fraktioner med en molekylvægt på over 7000 dalton. Denne behandling, som har til formål at homogenisere slutproduktet, gør det ifølge opfinderne muligt at formindske den anti-koagulerende virkning under bibeholdelse af ønsket antithrombotisk virkning.

Til trods for disse arbejder har de dannede blandinger stadig en tilbageværende blødningsfremkaldende virkning eller en alt for lav antithrombotisk virkning. Intet i den forpublicerede litteratur gør det muligt at bestemme hvilke

- 5 Den konklusion, som forfatterne til de ovenfor angivne artikler drager, er sigende: "Vi ved ikke hvilken, der er den optimale kombination af heparinets egenskaber. Nøjagtig karakterisering af forskellige præparater og sammenligning af egenskaberne med kliniske observationer kan eventuelt give et svar".

10

Det har nu vist sig, at det er muligt at opnå hepariner med fordelagtige egenskaber, især til forebyggelse og behandling af thrombotiske tilstande. Det har således uventet vist sig, at når slutproduktet indeholder både forbindelser med høj molekylvægt og forbindelser med lav molekylvægt, så udviser produktet en bedre virkning. I modsætning til hvad der fremgår af den kendte

15 teknik, synes det altså at være fordelagtigt, at der i slutblandingen bibeholdes forbindelser med høj molekylvægt samt en vis heterogenitet.

20

Farmakokinetiske undersøgelser af blandingerne ifølge opfindelsen viser, at de forener meget fordelagtige egenskaber.

25

Blandingerne ifølge opfindelsen har især en længere halveringstid end modent heparin og andre kendte produkter. Det er desuden vigtigt at understrege, at blandingerne ifølge opfindelsen i modsætning til heparin har en halveringstid, som er uafhængig af den injicerede dosis. Dette er interessant, da den fremkaldte virkning er meget mere forudsigelig end ved anvendelse af heparin.

30

Hos mennesker har blandingerne ifølge opfindelsen en udmærket biologisk tilgængelighed, bestemt ved hjælp af anti-Xa-aktiviteten. Således fås en værdi på ca. 30% for heparin og ca. 90% for blandingerne ifølge opfindelsen. Dette er meget fordelagtigt, da det muliggør formindskelse af de injicerede doser og forbedring af den terapeutiske virkning.

En anden vigtig egenskab af blandingerne ifølge opfindelsen er den store absorptionshastighed. Denne egenskab gør det muligt at opnå en næsten øjeblikkelig biologisk virkning. Dette medfører en hurtigere og sikrere be-
5 handling af patienten.

En anden egenskab af blandingerne ifølge opfindelsen er, at de har en lav "clearance" sammenlignet med modent heparin og andre kendte produkter. Takket være den kemiske struktur, molekylvægten og sulfatindholdet udviser
10 blandingerne ifølge opfindelsen en god modstandsdygtighed mod nedbrydning (desulfatering, hydrolyse) og eliminering, hvilket forøger blandingeres terapeutiske virkning.

Blandingerne ifølge opfindelsen udviser desuden en længere opholdstid end udgangs-heparinet. Denne egenskab viser sig ved en forlængelse af den tid,
15 i hvilken produktet forbliver aktivt in vivo, og altså ved en bedre terapeutisk virkning.

Blandingerne ifølge opfindelsen har også en mindre følsomhed over for serumfaktorer, hvilket forøger virkningsvarigheden in vivo og muliggør anvendelse af lave doser.
20

Disse meget fordelagtige egenskaber fås ved, at man under fremstillingen regulerer visse strukturegenskaber af de tilstedeværende forbindelser og regulerer molekylvægtfordelingen. De dannede blandinger har et gunstigt forhold mellem fraktioner med høj molekylvægt og fraktioner med lav molekylvægt, hvilket giver blandingerne nødvendige antithrombotiske egenskaber
25 med en ubetydelig blødningsfremkaldende virkning. _____

De karakteristiske egenskaber udtrykkes ved hjælp af den procentuelle andel af tunge kæder respektive lette kæder og forholdet mellem blandingeres gennemsnitsmolekylvægt efter vægt og deres gennemsnitsmolekylvægt efter antal, som afspejler molekylvægtspredningen.
30

Den foreliggende opfindelse angår således blandinger af sulfaterede polysaccharider med den samme generelle struktur som de polysaccharider, der indgår i heparin, og disse blandinger er ejendommelige ved, at de har lavere gennemsnitsmolekylvægt efter vægt end heparin, at de indeholder mellem 9 og 20% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton og mellem 5 og 20% kæder med en molekylvægt på over 8000 dalton, og at forholdet mellem gennemsnitsmolekylvægten efter vægt og gennemsnitsmolekylvægten efter antal er mellem 1,3 og 1,6.

10

Det er desuden blevet konstateret, at det er muligt at forbedre blandingerne egenskaber yderligere ved at formindske deres indhold af urenheder. De fleste hepariner indeholder sådanne urenheder som nucleinsyrer, polypeptider og forskellige polysaccharider. Blandt disse kan især nævnes chondroitinsulfater, heparansulfat og dermatansulfat. På grund af den meget høje molekylvægt, de indgående substituenten og sulfateringsgraden kan hver og en af disse urenheder forstyrre fremstillingen af produktet (f.eks. depolymerisationen), så den endelige molekylvægtfordeling forandres. Urenhederne kan også direkte påvirke aktiviteten ved at modificere egenskaberne af de aktive kæder. Ifølge opfindelsen er det muligt at eliminere disse urenheder, hvorved der kan konstateres en forbedring af egenskaberne af de blandinger, som har været underkastet denne forbehandling. Virkningen af denne forbehandling kan måles ved anvendelse af dermatansulfat som urenhedsstandard.

25 Blandingerne af sulfaterede polysaccharider ifølge opfindelsen indeholder fortrinsvis mindre end 2% dermatansulfat.

Endvidere har blandingerne af sulfaterede polysaccharider ifølge opfindelsen fortrinsvis en gennemsnitsmolekylvægt efter vægt på mellem ca. 3500 og
30 5500 dalton.

Kæderne af de sulfaterede polysaccharider, som indgår i blandingerne ifølge opfindelsen, indeholder fortrinsvis en 2-O-sulfo-4-enopyranosuronsyre ved en af kædeenderne.

- 5 Den foreliggende opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af blandinger af sulfaterede polysaccharider, som har lavere gennemsnitsmolekylvægt end heparin og indeholder mellem 9 og 20% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton og mellem 5 og 20% kæder med en molekylvægt på over 8000 dalton, og hvori forholdet mellem gennemsnitsmolekylvægten efter vægt og gennemsnitsmolekylvægten efter antal er mellem 1,3
10 og 1,6, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at den omfatter følgende trin:

- (a) i et første trin omdannes heparin i vandholdigt medium til et salt
15 deraf ved hjælp af et katernært ammoniumsalt med lang kæde,
(b) i et andet trin forestres det dannede salt til dannelse af en ester med en forestringsgrad på mellem 9,5 og 14%, og
(c) i et tredje trin depolymeriseres den dannede ester med en
forestringsgrad på mellem 9,5 og 14%.

20

Det er blevet konstateret, at man kan regulere depolymerisationsniveauet og dermed slutproduktets molekylære egenskaber ved at forestre saltet af udgangsheparinet til passende forestringsgrad.

- 25 Ifølge opfindelsen er det altså muligt direkte og på reproducerbar måde at fremstille blandinger af sulfaterede polysaccharider med de ovenfor angivne egenskaber.

- 30 Det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendte udgangsheparin er fortrinsvis et svineheparin, især fra svineslimhinde. Det har vist sig, at aktiviteten af de dannede blandinger kan variere væsentligt afhængigt af udgangsheparinets oprindelse. Når udgangsheparinet hidrører fra kvæg, fås

således blandinger med højere antikoagulerende virkning, end når heparinet hydrerer fra grises tarmslimhinde.

5 Ifølge en særligt foretrukken variant af fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemføres desuden et indledende trin til udfældning af udgangsheparinet ved hjælp af en alkohol. Denne forbehandling gør det muligt at formindske indholdet af urenheder af typen chondroitinsulfat og heparansulfat. En alkohol, som giver gode resultater ved denne behandling, er methanol.

10 Natriumheparinets renhed kan dernæst bestemmes ved væskechromatografi med sterisk udelukkelse.

Dette indledende trin gør det især muligt at fremstille et heparin med et indhold af dermatansulfat på mindre end 2%.

15

Saltdannelsen af heparinet gennemføres på følgende måde.

Heparinsaltet kan fremstilles ved, at et overskud af tilsvarende salt omsættes med et natriumheparin i vandholdigt medium ved en temperatur nær 20°C.

20 Det anvendte kvaternære ammoniumsalt er fortrinsvis et benzethoniumsalt, især benzethoniumchlorid, som kan omsættes med natriumheparinet.

Forestringen i det andet trin af fremgangsmåden gennemføres på følgende måde.

25

Den partielle heparinester i form af salt, hvis forestringsgrad er på mellem 9,5 og 14%, kan fremstilles ved forestring af det kvaternære ammoniumsalt (med lang kæde) af heparin i et chloreret organisk opløsningsmiddel i nærværelse af en chlorforbindelse. Reaktionen effektivitet kan forøges ved regulering af andelen af de forskellige reaktionskomponenter, reaktionstemperaturen og reaktionstiden.

30

Den partielle heparinester er hensigtsmæssigt en aromatisk ester.

Den anvendte chlorforbindelse er fortrinsvis benzylchlorid, og det chlorerede opløsningsmiddel er fortrinsvis chloroform eller methylenchlorid.

- 5 For at forestringsgraden skal blive på mellem 9,5 og 14%, er det især hensigtsmæssigt, at der per vægtdel heparinsalt anvendes 1 volumendel chlorforbindelse i 3-5 volumendele chloreret organisk opløsningsmiddel, samt at reaktionen gennemføres i løbet af 15-48 timer ved en temperatur på mellem 25 og 45°C, fortrinsvis på mellem 30 og 40°C.

10

Ifølge en foretrukken udførelsesform foreligger den partielle heparinester i form af natriumsalt.

- 15 De således dannede estere kan udvindes ved udfældning ved hjælp af en alkohol, især methanol, i nærværelse af natriumacetat. Der anvendes fortrinsvis mellem 1 og 1,2 volumener alkohol per volumen reaktionsmedium. Esterens forestringsgrad kan kontrolleres ved højeffektiv væskechromatografi. Når der er tale om en benzylester, kan man måle den mængde benzylalkohol, som fås ved forsæbning af esteren ved 0°C.

20

Det sidste trin af fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemføres hensigtsmæssigt på følgende måde.

- 25 Depolymerisationen sker fortrinsvis ved, at esteren behandles med en stærk base i vandig opløsning. Fortrinsvis anvendes natriumhydroxid.

Vægtforholdet mellem base og ester er hensigtsmæssigt mellem 0,05 og 0,2, fortrinsvis mellem 0,08 og 0,15.

- 30 Reaktionsmediets temperatur indstilles til en værdi på mellem 50 og 70 °C, fortrinsvis mellem 55 og 65 °C, og reaktionen gennemføres i løbet af 30 minutter til 3 timer, fortrinsvis i løbet af 1-2 timer.

Det er desuden hensigtsmæssigt at gennemføre reaktionen i et medium, hvori vægtforholdet mellem vand og ester er mellem 15 og 30.

5 Ifølge en særligt fordelagtig udførelsesform gennemføres depolymerisationen ved, at én vægtdele af den i trin 2 dannede aromatiske ester af heparin i form af salt, hvis forestringsgrad er på mellem 9,5 og 14%, blandes med 0,08 – 0,15 vægtdele natriumhydroxid og 20-30 vægtdele vand, hvorefter den dannede blanding holdes ved en temperatur på mellem 55 og 65 °C i 1-2 timer.

10 Produktet kan udvindes ved, at reaktionsmediet neutraliseres ved hjælp af en fortyndet mineralsyre, fortrinsvis saltsyre, hvorpå udfældning gennemføres ved hjælp af en alkohol, såsom methanol.

15 På denne måde er det muligt direkte og på reproducerbar måde at fremstille en blanding af sulfaterede polysaccharider, som indeholder mellem 9 og 20% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton og mellem 5 og 20% kæder med en molekylvægt på over 8000 dalton, som har en gennemsnitsmolekylvægt på mellem 3500 og 5500 dalton, og hvori forholdet mellem gennemsnitsmolekylvægten efter vægt og gennemsnitsmolekylvægten efter antal er
20 mellem 1,3 og 1,6.

Blandingerne ifølge opfindelsen kan hensigtsmæssigt anvendes som antitrombotiske midler.

25 De kan især anvendes til at forhindre venethromboser ved risiko-tilstande. Dette gælder også ved langvarige risiko-tilstande. Blandingerne ifølge opfindelsen gør det for første gang muligt ved bestemte doser at formindske risikoen for thrombotiske tilstande ved ortopædisk kirurgi. Denne risiko, som er 70% i fraværelse af behandling og ca. 25% i nærværelse af heparin, er ca.
30 10% ved anvendelse af blandingerne ifølge opfindelsen eller til og med endnu mindre.

Ved indsprøjtning af blandingerne ifølge opfindelsen i en kunstig nyres rørsystem kan forekomsten af thromboser formindskes. Den sidstnævnte anvendelse kan udvides til forhindring af thromboser i kirurgisk materiel.

- 5 En anden fordelagtig terapeutisk anvendelse af blandingerne ifølge opfindelsen er forhindring af thrombotiske tilstande i arterierne, især ved myocardiinfarkt.

10 Det er desuden meget fordelagtigt at anvende blandingerne ifølge opfindelsen til forhindring af venethromboser hos kirurgiske patienter ved behandling efter operationen. Denne anvendelse er meget fordelagtig, da den gør det muligt at undgå de blødningsrisici under operation og de problemer med type og dosis af bedøvelsesmidler, som kan optræde ved behandling før operation.

15 Alle disse egenskaber viser de terapeutiske muligheder for præparaterne ifølge opfindelsen.

20 Opfindelsen illustreres ved hjælp af de følgende, ikke-begrænsende eksempler.

Bestemmelsesmetoder

25 Produkternes molekylvægte og molekylvægtfordelinger bestemmes ved højtryksvæskechromatografi med anvendelse af to serieforbundne søjler (f.eks. de søjler, som forhandles under betegnelserne "TSK G 3000SW" (30 x 0,75 cm) og "Lichrosorb 100 Diol" 10 μ (25 x 0,75 cm) eller "TSK G 2000SW", forbundet til en refraktometrisk detektor. Det anvendte opløsningsmiddel er en 0,3 M phosphatpuffer med en pH-værdi på 7, og strømmen er 0,7 ml pr. minut. Systemet kalibreres med standarder fremstillet ved fraktionering af enoxaparin ("Pharmuka") ved udelukkelseschromatografi på agarose-poly-acrylamid ("IBF") ifølge den metode, der er beskrevet af BarrowCliffe et al., Thromb. Res., 12, 27-36 (1977-1978) eller D.A. Lane et al.,

Thromb. Res., 12, 257-271 (1977-1978). Resultaterne beregnes ved hjælp af dataprogrammet GPC6 (Perkin Elmer).

I de følgende eksempler måles blandingerne totale antikoagulerende virkning ved turbidimetri med anvendelse af den første internationale standard for heparin med lav molekylvægt. Virkning mod faktor Xa (den antithrombotiske virkning) måles ifølge den amidolytiske metode på chromogent substrat, der er beskrevet af Teien et al., Thromb. Res., 10, 399-410 (1977), idet der anvendes den første internationale standard for heparin med lav molekylvægt.

Eksempel 1

Dette eksempel illustrerer den indledende behandling af natriumheparin til formindskelse af indholdet af urenheder af typen chondroitinsulfat og heparansulfat.

Til en opløsning af 10 g kommercielt natriumsalt af heparin i 100 ml vand indeholdende 3 g natriumchlorid sættes 80 ml methanol. Efter udfældning frafiltrereres produktet, hvorpå det vaskes og tørres. Renhedsgraden af det herved dannede natriumheparin måles ved væskechromatografi med sterisk udelukkelse. Herved anvendes to serieforbundne søjler, nemlig de søjler, som forhandles under betegnelserne "TSK 2000SW" (60 x 0,75 cm) og "TSK 3000SW" (60 x 0,75 cm), koblet til en UV-detektor indstillet på 206 nm. Den anvendte mobile fase er en 0,5 M vandig opløsning af natriumsulfat, som cirkulerer med en strømning på 1 ml per minut. Prøven sammenlignes med en heparinstandard indeholdende 2% dermatansulfat.

Under de ovenfor angivne betingelser indeholder det dannede heparin mindre end 2% dermatansulfat.

Eksempel 2

Dette eksempel illustrerer fremstillingen af det kvaternære ammoniumsalt af heparin.

5

Til en opløsning af 10 g natriumheparinat ifølge eksempel 1 indeholdende mindre end 2% dermatansulfat i 100 ml vand sættes en opløsning af 25 g benzethoniumchlorid i 125 ml vand. Produktet, som fås ved stuetemperatur, frafiltreres, vaskes med vand og tørres.

10

På samme måde fremstilles benzethoniumsaltet af et heparin, som ikke er underkastet den i eksempel 1 beskrevne behandling.

Eksempel 3

15

Dette eksempel illustrerer fremstillingen af blandinger ifølge opfindelsen og disse blandingers egenskaber.

(1) Forestring.

20

Til en opløsning af 15 g benzethoniumheparinat (forbehandlet ved fremgangsmåden beskrevet i eksempel 1) i 75 ml methylenchlorid sættes 15 ml benzylchlorid. Opløsningen opvarmes ved en temperatur på 35 °C, som opretholdes i 25 timer. Derefter tilsættes 90 ml af en 10%’s opløsning af natriumacetat i methanol. Bundfaldet frafiltreres, vaskes med methanol og tørres. Herved fås 6,5 g heparin-benzylester i form af natriumsalt, hvis forestringsgrad (bestemt på den ovenfor angivne måde) er 13,3%.

25

(2) Depolymerisation.

30

10 g heparin-benzylester i form af natriumsalt (dannet på den ovenfor beskrevne måde) opløses i 250 ml vand. Den dannede opløsning opvarmes til 62 °C, og der tilsættes 0,9 g natriumhydroxid. Temperaturen holdes ved 62°C

i 1 time og 30 minutter. Reaktionsblandingen afkøles derpå til 20 °C og neutraliseres ved tilsætning af fortyndet saltsyre. Natriumchlorid-koncentrationen i reaktionsmediet indstilles derpå på 10%. Produktet udfældes sluttelig i 750 ml methanol, hvorpå det frafiltreres og tørres. Herved fås et heparin med de

5 følgende egenskaber.

Gennemsnitsmolekylvægt efter vægt: 3900 dalton.

Molekylvægtfordeling:

20% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton,

10 5,5% kæder med en molekylvægt på over 8000 dalton.

Spredning: $d = 1,39$.

Anti-Xa-aktivitet: 106 internationale enheder (IE/mg).

Antikoagulerende virkning: 22,6 IE/mg.

15 Eksempel 4

Idet der går ud fra estere med en forestringsgrad på mellem 9,5 og 14% fremstilles på lignende måde depolymeriserede hepariner med de følgende egenskaber.

20

(a) Gennemsnitsmolekylvægt efter vægt: 4425 dalton.

Molekylvægtfordeling:

12,4% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton,

9,3% kæder med en molekylvægt på over 8000 dalton.

25 Spredning: $d = 1,37$.

Anti-Xa-virkning: 102 IE/mg.

Antikoagulerende virkning: 33 IE/mg

30 (b) Gennemsnitsmolekylvægt efter vægt: 4579 dalton.

Molekylvægtfordeling:

11,2% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton.

10,4% kæder med en molekylvægt på over 8000 dalton.

Spredning: $d = 1,37$.

Anti-Xa-virkning: 104 IE/mg.

Antikoagulerende virkning: 37 IE/mg.

- (c) Gennemsnitsmolekylvægt efter vægt: 4446 dalton.
- 5 Molekylvægtfordeling:
 12,6% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton.
 9,5% kæder med en molekylvægt på over 8000 dalton.
 Spredning: $d = 1,38$.
 Anti-Xa-virkning: 100 IE/mg.
- 10 Antikoagulerende virkning: 32 IE/mg.

Eksempel 5

15 Dette eksempel illustrerer fremstillingen af en blanding, som ikke er omfattet af opfindelsen.

(1) Forestring.

20 Til en opløsning af 15 g benzethoniumheparinat (forbehandlet ifølge metoden beskrevet i eksempel 1) i 60 ml methylenchlorid sættes 12 ml benzylchlorid. Den fremkomne opløsning opvarmes til en temperatur på 28 °C, som opret-holdes i 30 timer. Derefter tilsættes der 90 ml af en 10%’s opløsning af natriumacetat i methanol. Bundfaldet frafiltreres, vaskes med methanol og tørres. Herved fås 6,3 g heparinbenzylester i form af natriumsalt. Dette produkts

25 forestringsgrad bestemmes ved, at man ved hjælp af højeffektiv væskechromatografi bestemmer den mængde benzylalkohol, som frigøres ved forsæbning af esteren ved 0 °C. Forestringsgraden er 9,2%.

(2) Depolymerisation.

30 10 g af den ovenfor fremstillede heparin-benzylester i form af natriumsalt opløses i 200 ml vand. Opløsningen opvarmes til 58°C, og der tilsættes 1,1 g natriumhydroxid. Temperaturen holdes ved 58 °C i 1 time. Reaktionsblandin-

gen afkøles dernæst til 20 °C og neutraliseres ved tilsætning af fortyndet salt-syre. Natriumchloridkoncentrationen i reaktionsmediet indstilles derefter på 10%. Produktet udfældes til slut i 600 ml methanol, hvorpå det frafiltreres og tørres. Herved fås et heparin med de følgende egenskaber.

5

Gennemsnitsmolekylvægt efter vægt: 5425 dalton.

Molekylvægtfordeling:

9,6% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton.

19,5% kæder med en molekylvægt på over 8000 dalton.

10

Spredning: $d = 1,44$.

Anti-Xa-virkning: 122 IE/mg.

Antikoagulerende virkning: 68,6 IE/mg.

15

Det fremgår af resultaterne, at dette produkt har en høj antikoagulerende virkning. Blandingerne fremstillet ifølge opfindelsen har således bedre egenskaber.

Eksempel 6

20

Dette eksempel illustrerer den forbedrede stabilitet in vivo af blandingerne ifølge opfindelsen, udtrykt ved hjælp af halveringstiden i plasma.

25

Et første farmakokinetisk forsøg blev gennemført med frivillige forsøgspersoner med en alder på mellem 21 og 30 år. Forsøgspersonerne modtager injektioner i doser fra 20 til 80 mg pr. ml. Blodprøver med et volumen på 4,5 ml tages på forskellige tidspunkter og opbevares ved ca. 4 °C. Prøverne centrifugeres derefter ved 2300 g i 15 minutter, og et plasma, som er fattigt på blodplader, fraskilles og fryses før analyse. Blandingernes halveringstid bestemmes dernæst ved måling af anti-Xa-virkning. Der gøres nedenfor rede for de fremkomne resultater.

30

Når de i eksempel 3 og 4 fremstillede blandinger indgives i en dosis på 40 mg, er halveringstiden længere end 4 timer i 75% af tilfældene, og halve-

ringstiden er længere end 4,5 timer i 45% af tilfældene. Ved en dosis på 60 mg er halveringstiden længere end 3,7 timer i 75% af tilfældene. Når intakt heparin injiceres intravenøst under identiske doseringsbetingelser, måles en halveringstid på ca. 0,6 timer. Et produkt fremstillet ifølge den fremgangsmåde, som beskrives i det europæiske patentskrift nr. 40.144, udviser en halveringstid på over 4,5 timer i 17% af tilfældene.

Et andet forsøg gennemførtes under lignende betingelser med anvendelse af 20 patienter. Når blandinger ifølge opfindelsen indgives i en dosis på 40 mg, er halveringstiden over 4 timer i 80% af tilfældene, og halveringstiden er over 4,5 timer i ca. 40% af tilfældene. Ved en dosis på 20 mg er halveringstiden over 3,9 timer i 60% af tilfældene.

PATENTKRAV

1. Blandinger af sulfaterede polysaccharider med samme generelle struktur som de polysaccharider, der indgår i heparin, k e n d e t e g n e t ved, at de har lavere gennemsnitsmolekylvægt efter vægt end heparin, at de indeholder mellem 9 og 20% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton og mellem 5 og 20% kæder med en molekylvægt på over 8000 dalton, og at forholdet mellem gennemsnitsmolekylvægten efter vægt og gennemsnitsmolekylvægten efter antal er på mellem 1,3 og 1,6.
2. Blandinger ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at de indeholder mindre end 2% dermatansulfat.
3. Blandinger ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at de har en gennemsnitsmolekylvægt efter vægt på mellem ca. 3500 og ca. 5500 dalton.
4. Blandinger ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at kæderne af sulfaterede polysaccharider indeholder en 2-O-sulfo-4-enopyranosuronsyre ved en af kædeenderne.
5. Fremgangsmåde til fremstilling af blandinger af sulfaterede polysaccharider ifølge ethvert af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at der gennemføres de følgende trin:
- (a) i et første trin omdannes et heparin i vandholdigt medium til et salt deraf ved hjælp af et kvaternært ammoniumsalt med lang kæde,
- (b) i et andet trin forestres det fremkomne salt til en ester med en forestringsgrad mellem 9,5 og 14%, og
- (c) i et tredje trin depolymeriseres den fremkomne ester med en forestringsgrad mellem 9,5 og 14%.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det andet trin gennemføres i et chloreret organisk opløsningsmiddel i nærværelse af en chlorforbindelse.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, *k e n d e t e g n e t* ved, at chlorforbindelsen er benzylichlorid, og at opløsningsmidlet er chloroform eller methylenchlorid.

5

8. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 5-7, *k e n d e t e g n e t* ved, at forestringen gennemføres ved blanding af 1 vægt del heparinsalt med ca. 1 volumendel af en chlorforbindelse i 3-5 volumendele af et chloreret organisk opløsningsmiddel ved en temperatur på mellem 25 og 45°C, fortrinsvis mellem 30 og 40°C.

10

9. Fremgangsmåde ifølge krav 5, *k e n d e t e g n e t* ved, at det tredje trin gennemføres ved, at esteren behandles med en stærk base i vandig opløsning.

15

10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, *k e n d e t e g n e t* ved, at vægtforholdet mellem base og ester er mellem 0,05 og 0,2, fortrinsvis mellem 0,08 og 0,15.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 9, *k e n d e t e g n e t* ved, at vægtforholdet mellem vand og ester er mellem 15 og 30.

20

12. Fremgangsmåde ifølge krav 9, *k e n d e t e g n e t* ved, at mediets temperatur indstilles på en værdi på mellem 50 og 70°C, fortrinsvis mellem 55 og 65°C, og at reaktionen gennemføres i løbet af 30 minutter til 3 timer, fortrinsvis i løbet af 1-2 timer.

25

13. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 5-12, *k e n d e t e g n e t* ved, at man i et indledende trin udfælder udgangsheparinet ved hjælp af en alkohol.

30

14. Fremgangsmåde ifølge krav 5, *k e n d e t e g n e t* ved, at urenheder fjernes fra blandingerne.

15. Fremgangsmåde ifølge krav 14, k e n d e t e g n e t ved, at urenheder valgt blandt nucleinsyrer, polypeptider og polysaccharider, især chondroitin-sulfater, heparan- og dermatansulfat, fjernes.
- 5 16. Fremgangsmåde ifølge krav 15, k e n d e t e g n e t ved at dermatan-sulfatet fjernes til et restindhold på under 2%.
17. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav 5 og 14-16, k e n d e t e g n e t ved, at der fremstilles blandinger med en gennemsnitsmolekyl-
10 vægt mellem ca. 3500 dalton og ca. 5500 dalton.
18. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at i det første trin omdannes heparinet til benzethoniumsaltet.
- 15 19. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at i det andet trin gennemføres forestringen med et chlorderivat, især benzylchlorid.
20. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at i det andet trin gennemføres forestringen med et organisk opløsningsmiddel.
20
21. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at i det andet trin reguleres mængderne af de forskellige reagenser og temperaturen og reakti-
onstiden.
- 25 22. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at i det andet trin af forestringen dannes en aromatisk ester som heparinester.
- 30 23. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at esteren, der er dannet i det andet trin, udvindes ved udfældning med alkohol, især methanol, i nærværelse af natriumacetat.

24. Fremgangsmåde ifølge krav 5, *k e n d e t e g n e t* ved, at forestringsgraden af heparinesteren reguleres, især ved højeffektiv væskechromatografi i væskefase.
- 5 25. Fremgangsmåde ifølge krav 5, *k e n d e t e g n e t* ved, at i det tredje trin gennemføres depolymerisationen med en stærk base i vandig opløsning, især med natriumhydroxid.
- 10 26. Anvendelse af blandinger af sulfaterede polysaccharider ifølge et vilkårligt af kravene 1-4 til fremstilling af terapeutiske præparater.
27. Anvendelse ifølge krav 26 til fremstilling af terapeutiske præparater beregnet til anvendelse til forhindring af venethromboser efter operationer.
- 15 28. *Terapeutisk præparat på basis af blandinger af sulfaterede polysaccharider med samme generelle strukturer som de polysaccharider, der indgår i heparin, og som har en lavere gennemsnitsmolekylvægt efter vægt end heparin, som indeholder mellem 9 og 20% kæder med en molekylvægt på under 2000 dalton og mellem 5 og 20% kæder med en molekylvægt på over*
- 20 *8000 dalton, og hvis forhold mellem gennemsnitsmolekylvægten efter vægt og gennemsnitsmolekylvægten efter antal ligger mellem 1,3 og 1,6.*
29. Præparat ifølge krav 28, som er et antithrombotisk præparat.