



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1852926 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200480026542.0

(22) 申请日 2004.07.22

(30) 优先权数据

0309041 2003.07.24 FR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.03.15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FR2004/001943 2004.07.22

(87) PCT申请的公布数据

W02005/010051 FR 2005.02.03

(73) 专利权人 安万特医药股份有限公司

地址 法国安东尼

(72) 发明人 V·劳克斯 P·穆里耶

C·维斯科夫

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 隋晓平

(51) Int. Cl.

C08B 37/10 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 9855515 A1, 1998.12.10, 权利要求

1-42、说明书第8页第19行至第18页第17行。

US 20020055621 A1, 2002.05.09, 权利要求
1-46、说明书第0016-0045段, 实施例1-7.

CN 1379781 A, 2002.11.13, 权利要求6-15、
说明书第1页倒数第2行至第5页第4行。

US 6384021 B1, 2002.05.07, 权利要求1, 4、
说明书第1栏第61行至第2栏第44行。

Jean Choay, et al.. Structural
studies on a biologically active
hexasaccharide obtained from
heparin. Annals New York Academy of
Sciences 370. 1981, 370644-649.

审查员 冯刚

权利要求书 3 页 说明书 17 页

(54) 发明名称

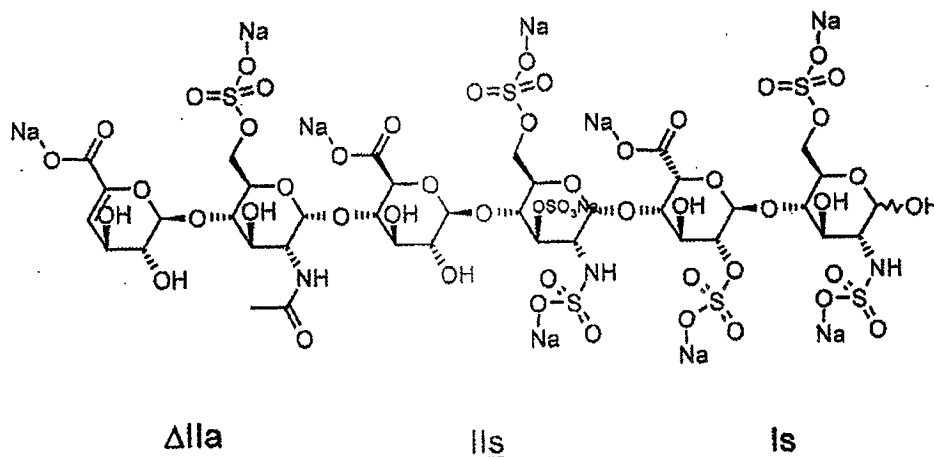
由肝素衍生的寡糖混合物、其制备方法与含
有所述混合物的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及由肝素衍生的寡糖混合物, 它们的
平均分子量是 1800-2400 道尔顿, 其特征在于
高 aXa 活性与没有 aIIa 活性。本发明还涉及其制
备方法以及含有所述混合物的药物组合物。

1. 寡糖混合物, 其中所述寡糖具有组成肝素的多糖的通式结构, 还具有下述特征:

- 平均分子量 1800-2400 道尔顿,
- 抗 Xa 活性为 190-450IU/mg,
- 抗 IIa 活性小于 0.2IU/mg,
- 混合物中存在的寡糖:
- 含有 2-16 个糖结构单元,
- 在其中一个末端有 4,5- 不饱和糖醛酸 -2-0- 硫酸酯结构单元,
- 并且含有下式的六糖:



其特征在于在寡糖混合物中含有 20-100% 的六糖部分, 并且该六糖部分含有 20-70% 如上述所限定的六糖 ΔIIa-II_S-Is。

2. 根据权利要求 1 所述的寡糖混合物, 其特征在于在寡糖混合物中含有 30-60% 的六糖部分。

3. 根据权利要求 1 所述的寡糖混合物, 其特征在于该六糖部分含有 25-50% 如权利要求 1 所限定的六糖 ΔIIa-II_S-Is。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项权利要求所述的寡糖混合物, 其特征在于它的平均分子量是 1900-2200 道尔顿。

5. 根据权利要求 4 所述的寡糖混合物, 其特征在于它的平均分子量是 1950-2150 道尔顿。

6. 根据权利要求 1-3 中任一项权利要求所述的寡糖混合物, 其特征在于它的抗 Xa 活性是 190-410IU/mg, 同时抗 IIa 活性小于 0.2IU/mg。

7. 根据权利要求 6 所述的寡糖混合物, 其特征在于它的抗 Xa 活性是 200-300IU/mg。

8. 根据权利要求 1-3 中任一项权利要求所述的寡糖混合物, 其特征在于它具有下述特征:

- 平均分子量是 1950-2150 道尔顿,
- 抗 Xa 活性是 190-410IU/mg, 且抗 IIa 活性小于 0.2IU/mg,
- 寡糖混合物含有 30-60% 的六糖部分, 而所述六糖部分含有 25-55% 的 ΔIIa-II_S-Is。

9. 制备根据权利要求 1-8 中任一项权利要求所述寡糖混合物的方法, 其特征在于抗 Xa 活性高于 140IU/mg、抗 IIa 活性低于 5IU/mg 且平均分子量为 2000-3000 道尔顿的非常低分

子量肝素进行下述化学反应：

- a) 通过苄索氯铵作用进行盐交换得到肝素苄乙铵，
- b) 通过苄基氯的作用使得到的肝素苄乙铵酯化并处理，从而得到非常低分子量的肝素苄酯钠盐，
- c) 使得到的非常低分子量的肝素苄酯钠盐进行盐交换，得到季铵盐，
- d) 使用 pka 高于 20 的强有机碱进行解聚作用，以得到解聚的非常低分子量的肝素季铵盐，
- e) 将解聚的非常低分子量的肝素季铵盐转化成钠盐，
- f) 进行残留酯皂化，并任选进行纯化。

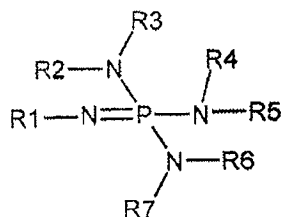
10. 根据权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于解聚步骤 d) 中使用的强碱 / 酯摩尔比是 0.2-5。

11. 根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于解聚步骤 d) 中使用的强碱 / 酯摩尔比是 0.6-2。

12. 根据权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于使用膦腈碱进行解聚步骤 d)。

13. 根据权利要求 9-12 中任一项权利要求所述的制备方法，其特征在于以非常低分子量的肝素苄酯、苄乙铵盐计，使用 1 摩尔当量膦腈碱操作时，以水含量小于 0.3% 进行解聚步骤 d)。

14. 根据权利要求 12 所述的制备方法，其特征在于解聚步骤 d) 中使用的膦腈碱是下式的碱：



式中， R_1 - R_7 基相同或不同，代表含有 1-6 个碳原子的直链、支链或环状烷基，或者 R_3 和 R_4 与它们带有的 $-\text{N}-\text{P}-\text{N}-$ 基团构成 6 元杂环。

15. 根据权利要求 12 所述的制备方法，其特征在于解聚步骤中使用的膦腈碱是 2-叔丁基亚氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基全氢-1,3,2-二氮杂磷杂苯。

16. 根据权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于步骤 b) 中肝素苄酯钠盐的酯化率是 40-100%。

17. 根据权利要求 16 所述的制备方法，其特征在于步骤 b) 中肝素苄酯钠盐的酯化率是 70-90%。

18. 根据权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于在温度 15-25°C 下，使用乙酸钠醇溶液处理反应介质，将根据权利要求 9 步骤 b) 的方法制备的非常低分子量肝素苄酯季铵盐转化为非常低分子量肝素苄酯钠盐。

19. 根据权利要求 18 所述的制备方法，其特征在于所述乙酸钠醇溶液为 10% 重量 / 体积的乙酸钠甲醇溶液。

20. 根据权利要求 18 所述的制备方法，其特征在于酯化步骤 b) 中添加的乙酸钠重量当量是解聚反应所使用肝素苄酯季铵盐质量的 3 倍。

21. 根据权利要求 9 所述的制备寡糖混合物的方法,其特征在于步骤 c) 中得到的季铵盐是苜乙铵盐或鲸蜡基三甲基铵盐。

22. 根据权利要求 9 所述的制备方法,其特征在于在含水介质中,在温度 0-20℃ 下,使用碱金属氢氧化物进行步骤 f 的皂化。

23. 根据权利要求 22 所述的制备方法,其特征在于皂化反应在温度 0-10℃ 下进行。

24. 根据权利要求 22 所述的制备方法,其特征在于所述碱金属氢氧化物为氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化锂。

25. 根据权利要求 22 所述的制备方法,其特征在于使用 1-5 摩尔当量碱金属氢氧化物。

26. 根据权利要求 25 所述的制备方法,其特征在于使用 1-2 摩尔当量碱金属氢氧化物。

27. 根据权利要求 9 所述的制备方法,其特征在于通过使用装填聚丙烯酰胺琼脂糖类凝胶的柱层析来除去二糖和四糖部分。

28. 根据权利要求 9-12 中任一项权利要求所述制备权利要求 1-8 中任一项权利要求所述寡糖混合物的方法,其特征在于作为起始产品使用抗 Xa 活性是 100-140UI/mg 的分子量为 1500-3000 道尔顿的低分子量肝素或非常低分子量肝素代替如权利要求 9 所限定的非常低分子量肝素。

29. 根据权利要求 9-12 中任一项权利要求所述制备权利要求 1-8 中任一项权利要求所述寡糖混合物的方法,其特征在于作为起始产品使用抗 Xa 活性是 100-140UI/mg 的分子量为 1500-3000 道尔顿的非常低分子量肝素代替如权利要求 9 所限定的非常低分子量肝素。

30. 根据权利要求 28 所述的制备方法,其特征在于所述低分子量肝素选自依诺肝素、那屈肝素、达肝素、亭扎肝素、阿地肝素、舍托肝素、帕肝素、瑞维肝素和贝米肝素。

31. 采用权利要求 9-30 中任一项权利要求所述方法能得到的如权利要求 1-8 中任一项权利要求所述的寡糖混合物。

32. 药物,该药物由权利要求 1-8 中任一项权利要求所述的寡糖混合物作为药物。

33. 具有抗凝血活性的药物,该药物由权利要求 1-8 中任一项权利要求所述的寡糖混合物作为药物。

34. 根据权利要求 32 或 33 所述的药物,用于治疗或预防静脉和动脉血栓形成、深静脉血栓形成、肺栓塞、不稳定心绞痛、心肌梗死、心肌缺血、外周动脉闭塞性疾患和心房纤颤、平滑肌细胞增生、动脉粥样硬化和动脉硬化,癌症,以及糖尿病。

35. 根据权利要求 34 所述的药物,其中所述糖尿病为糖尿病性视网膜病和糖尿病性肾病。

36. 药物组合物,该药物组合物含有至少一种如权利要求 32 所述的药物和一种或多种药用惰性赋形剂或载体或添加剂。

37. 根据权利要求 36 所述的药物组合物,其特征在于它们为皮下或静脉注射液。

38. 根据权利要求 36 所述的药物组合物,其特征在于它们为通过肺途径吸入用药的制剂。

39. 根据权利要求 36 所述的药物组合物,其特征在于它们为口服用药的制剂。

40. 测定根据权利要求 1-8 中任一项权利要求所述寡糖混合物的抗 Xa 活性的方法,其特征在于采用生色底物的酰胺水解法,其中复制缓冲液是聚乙二醇 6000。

由肝素衍生的寡糖混合物、其制备方法与含有所述混合物的药物组合物

[0001] 本发明涉及由肝素衍生的平均分子量为 1800-2400 道尔顿的寡糖混合物,其特征在于强抗 Xa(aXa) 活性和无抗 IIa(aIIa) 活性,本发明还涉及它们的制备方法与含有它们的药物组合物。

[0002] 这种肝素是一种动物源的硫酸化粘多糖混合物,主要是用于抗凝和抗血栓。

[0003] 但是,这种肝素的缺陷制约了其应用。特别是由于其高抗凝活性(aIIa)可能引起出血。(血栓形成与止血作用研讨会)(Seminars in Thrombosis and Hemostasis),第5卷补编,3(1999))。

[0004] 低分子量的肝素,特别是采用使肝素酯碱性去聚合所得到的和实际销售的低分子量肝素,例如依诺肝素(enoxaparine),也具有高 aIIa 活性。

[0005] 近来,在现有技术中曾描述一些非常低分子量的肝素。例如,在专利 US 6 384 021 中,这些产品的抗 Xa 活性是 100-120UI/mg,抗 IIa 活性是 2-8UI/mg。在国际申请 WO 02/08295 和 WO 2004/033503 中,这些产品的抗 Xa 活性具体是 100-190UI/mg,而抗 IIa 活性低于 5UI/mg。但是,任何这些非常低分子量肝素并不有效地具有高于 190UI/mg 的抗 Xa 活性,同时抗 IIa 活性为零或基本上为零(UI = 国际单位)。

[0006] 抗 IIa 活性基本上为零(换句话说,基本上没有抗 IIa 活性)应该理解为活性低于 0.2UI/mg。

[0007] 本发明的目的是提供寡糖混合物,它们对活化因子 X(因子 Xa) 具有非常高的选择性,同时不具有或基本上不具有抗 IIa 活性。

[0008] 因此,本发明的目的是提供寡糖混合物,它们具有肝素组成多糖的通式结构,还具有下述特征:

[0009] - 它们的平均分子量是 1800-2400 道尔顿,抗 Xa 活性是 190UI/mg-450UI/mg,没有或基本上没有抗 IIa 活性。

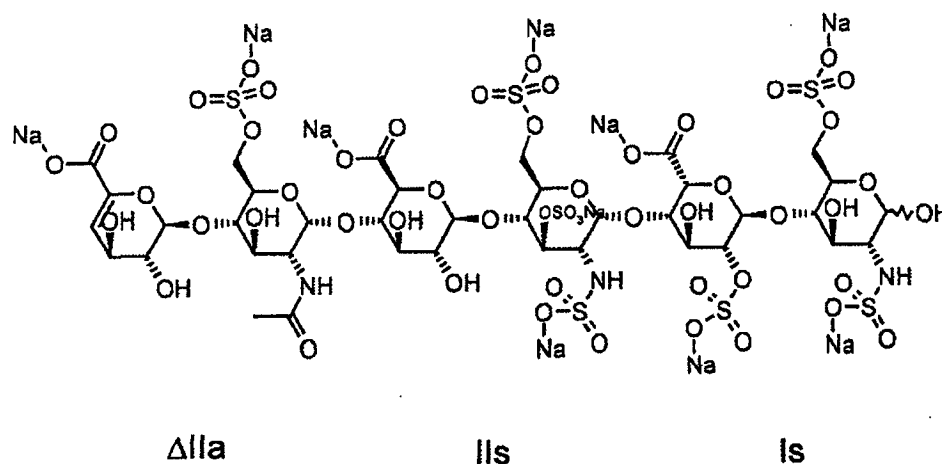
[0010] - 混合物的组成寡糖

[0011] - 含有 2-16 个糖结构单元,

[0012] - 在其中一个末端有 4,5- 不饱和糖醛酸 -2-0- 硫酸酯结构单元,

[0013] - 并且含有呈碱金属或碱土金属盐形式的下式六糖:

[0014]



[0015] 在本发明描述的寡糖混合物中含有的六糖 Δ IIa-II_S-Is 是一种对 ATIII 具有强亲合性的序列,其特征在于 aXa 活性高于 740UI/mg。

[0016] 作为碱金属或碱土金属盐,优选的是钠、钾、钙和镁盐。

[0017] 使用两个串联柱,例如以商品名 TSK G3000 XL 和 TSK G2000 XL 销售的这些柱,采用高压液相色谱法测定平均分子量。采用折射计进行检测。使用的洗脱剂是硝酸锂,流量是 0.6ml/min。采用通过琼脂糖-聚丙烯酰胺凝胶层析法分离依诺肝素 (IBF) 制备得到的标准品对上述系统进行校正。根据 Barrowcliffe 等人,《Thromb. Res.》,12,27-36(1977-78) 或 D. A. Lane 等人,《Thromb. Res.》,12,257-271(1977-78) 描述的技术完成这种制备。使用 GPC6 软件 (Perkin Elmer) 计算结果。

[0018] 根据 Teien 等人,《Thromb. Res.》,10,399-410(1977) 描述的原理,采用生色底物酰胺水解法 (méthode amydotyrique) 测定抗 Xa 活性。根据在现行欧洲药典有关低分子量肝素的专论中描述的方法进行定量,但是采用不同的复制缓冲液,即用聚乙二醇 6000 (PEG 6000) 代替在缓冲液 Tris-NaClpH7.4 中的白蛋白。

[0019] 相对于 140-180U/mg (干计) 的标准的非常低分子量肝素 (HTBPM) 测定抗 Xa 活性。相对于低分子量肝素的国际标准试样测定标准 HTBPM 的活性。

[0020] 根据专利申请 WO 02/08295,特别是 WO 2004/033503 所述方法制备了这个标准的 HTBPM。相对于低分子量肝素的国际标准试样测定标准 HTBPM 的活性。

[0021] 根据在现行欧洲药典有关低分子量肝素的专论中描述的方法,采用生色底物的酰胺水解法测定抗 IIa 活性。相对于标准的非常低分子量肝素 (HTBPM) 测定抗 IIa 活性,该肝素的测量活性是 2.1UI/mg。相对于低分子量肝素的国际标准试样测定标准 HTBPM 的活性。

[0022] 根据一个优选的方式,本发明的寡糖混合物含有 20-100% 六糖部分。特别是这种混合物含有 30-60% 六糖部分。

[0023] 另外,本发明的混合物在寡糖混合物六糖部分中含有 20-70% 六糖 Δ IIa-II_S-Is。特别优选,在六糖部分中部分 Δ IIa-II_S-Is 高达 25-50%。

[0024] 采用 TSK G3000 XL 和 TSK G2000 XL 柱的高压液相色谱法或采用六糖部分的制备分离法,测定六糖部分的百分数。

[0025] 在这种情况下,使用装填聚丙烯酰胺琼脂糖类凝胶的柱对这种混合物进行了层析分离。用碳酸氢钠溶液洗脱该混合物。优选碳酸氢钠溶液的浓度是 0.1-1mol/l。还更优选

进行分离的浓度是 1mol/l。采用紫外光谱测定法进行检测 (254nm)。在分离后,六糖部分的碳酸氢钠溶液用冰醋酸中和。然后,这种溶液减压浓缩达到醋酸钠浓度高于 30 重量%。该六糖部分用 3-5 个体积的甲醇进行沉淀。使用 3 号烧结玻璃过滤器过滤回收六糖部分。得到的六糖混合物可以采用高效液相色谱法 (HPLC) 分析测定其中六糖 Δ IIa-II_g-Is 的含量。根据本技术领域的技术人员采用的技术,采用制备性 HPLC 色谱法,或采用抗凝血酶 III 琼脂糖柱的亲合色谱法,可以分离六糖 Δ IIa-II_g-Is (M. Hook, I. Bjork, J. Hopwood 和 U. Lindahl,《F.E. B. Sletters,》656(1) (1976))。

[0026] 优选本发明混合物的平均分子量是 1900-2200 道尔顿,特别优选是 1950-2150 道尔顿。

[0027] 根据一个优选的方式,本发明寡糖混合物的特征在于,它的抗 Xa 活性是 190-410UI/mg,而抗 IIa 活性是零或基本上为零。非常特别优选抗 Xa 活性是 200-300UI/mg。

[0028] 因此,特别优选本发明的目的是具有下述特征的混合物:

[0029] - 平均分子量是 1950-2150 道尔顿,

[0030] - 抗 Xa 活性是 190-410UI/mg,抗 IIa 活性是零或基本上为零,

[0031] - 它们含有 30-60%六糖部分,该部分含有 25-55%的 Δ IIa-II_g-Is 部分。

[0032] 通过下面公开的非常独特方法得到本发明寡糖混合物的活性。本技术领域的技术人员熟知,多糖混合物的物理化学特征以及由其活性与获得的方法相关(《J. Med. Chem》33(6)1639-2093(1990))。

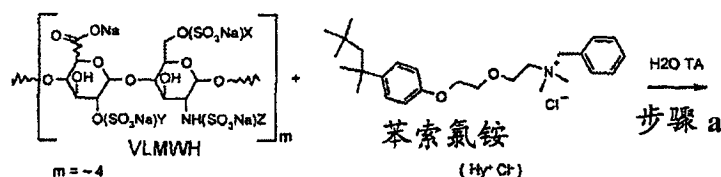
[0033] 在有机介质中使非常低分子量肝素 (HTBPM) 苄酯季铵盐解聚可制备本发明的寡糖混合物,这种 HTBPM 本身是根据专利申请 WO 02/08295 和 WO 2004/033503 所述方法制备的。一般而言,涉及使非常低分子量肝素再解聚,而它特别是在强碱存在下,优选地在二氯甲烷中以及在低于 3%水的存在下使酯化肝素解聚得到的。

[0034] 特别地是可根据在专利申请 WO 02/08295 和 WO 2004/033503 中描述的方法制备出在本发明中作为原料使用的 HTPBM。

[0035] 特别地,作为起始产品使用的 HTBPM 的 aXa 活性高于 140UI/mg, aIIa 活性低于 5UI/mg,平均分子量是 2000-3000 道尔顿。相对于标准 HTBPM 测定 aXa 活性,而标准 HTBPM 测量活性是 158UI/mg。相对于低分子量肝素标准国际试样测定标准 HTBPM 活性。

[0036] 使用 pKa 优选地高于 20 的强有机碱使根据如前面所描述方法得到的起始 HTPBM 再解聚(例如 R. Schwesinger 等人,《Angew. Chem. Int. Ed. Engl.》26,1167-1169(1987) 或 R. Schwesinger 等人,《Angew. Chem.》105,1420(1993) 定义了优选腈腈族的性质)。然后,把解聚 HTBPM 苄酯季铵盐转化成钠盐,皂化这些残留酯并且任选地纯化所得到的产物。下面反应流程图说明了本发明:

[0037]

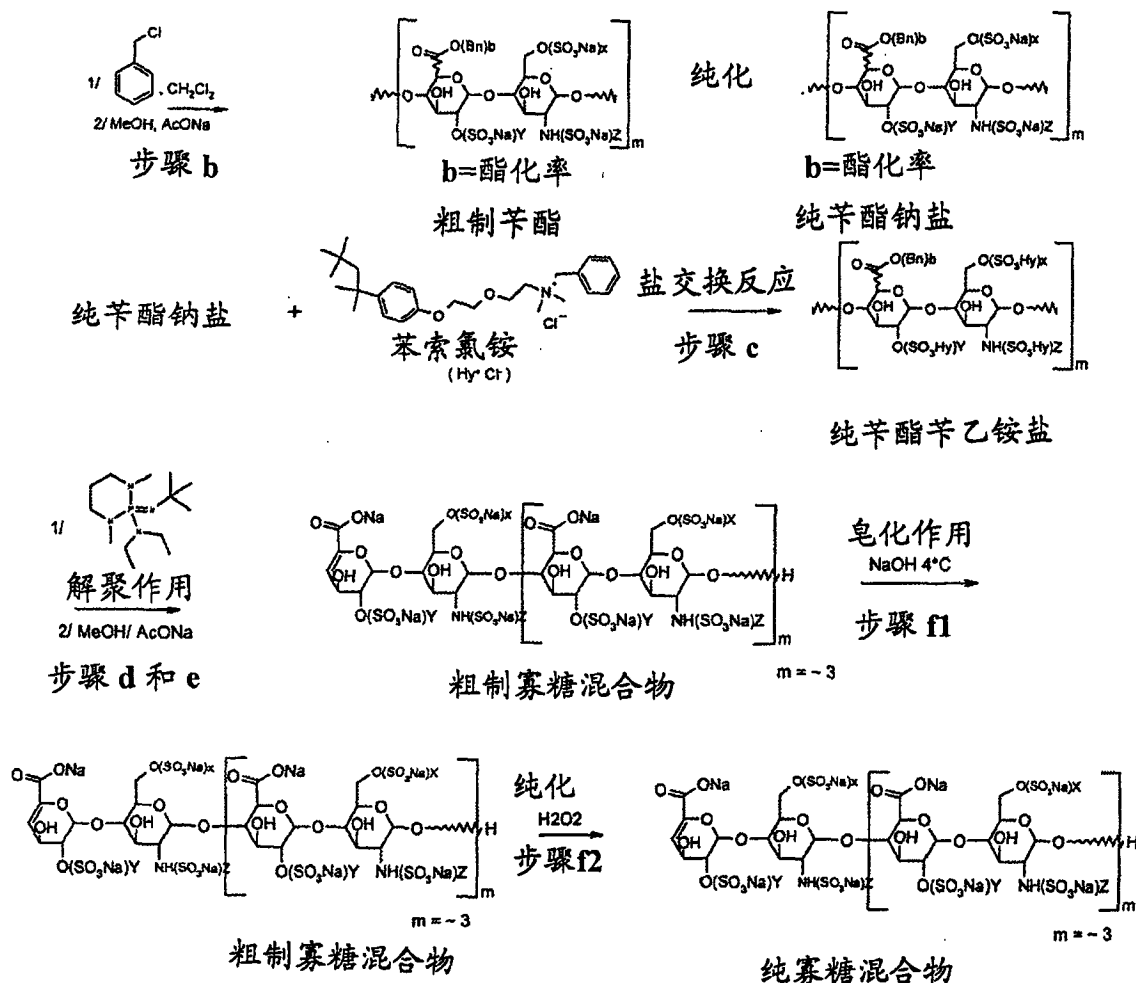


[0038] $n = X+Y+Z$ (平均二糖总硫酸化率)

[0039] x = 位点硫酸化率, 用 H 基表示补充部分

[0040] Y = 位点硫酸化率, 用 H 基表示补充部分 Z = 位点硫酸化率, 用 COCH_3 基表示补充部分

[0041]



[0042] 因此, 本发明的另一个目的是一种如前面定义的寡糖混合物的制备方法, 其特征在于非常低分子量肝素的 αXa 活性高于 140UI/mg 、 αIIa 活性低于 5UI/mg 且平均分子量 $2000\text{--}3000$ 道尔顿, 该肝素进行下述化学反应:

[0043] a) 通过苯索氯铵作用进行盐交换得到肝素芋乙铵 (*héparinate debenzétonium*),

[0044] b) 通过芋基氯的作用使得到的肝素芋乙铵酯化, 并用乙酸钠醇溶液处理得到非常低分子量的肝素芋酯钠盐,

[0045] c) 得到的芋酯进行盐交换作用, 得到季铵盐, 优选芋乙铵盐 (*benzéthonium*)、鲸蜡基吡啶鎓或鲸蜡基三甲基铵盐,

[0046] d) 通过 pKa 优选高于 20 的强有机碱的解聚作用, 以得到非常低分子量的解聚肝素,

[0047] e) 将非常低分子量的解聚肝素季铵盐转化成钠盐,

[0048] f) 进行残留酯的皂化并任选地纯化。

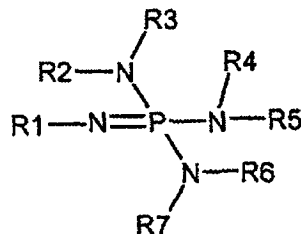
[0049] 在本发明中, 非常特别优选在解聚步骤 (步骤 d) 中, 通过利用膦腈碱的高选择性, 可以使寡糖混合物中对 ATIII 有亲合性的序列出乎预料之外地富集。优选强碱 / 酯摩尔比

是 0.2-5, 非常特别地 0.6-2。

[0050] 对于最佳选择性和最大保存对 ATIII 有亲和性的序列, 使用以 HTBTM 苄酯, 苄乙铵盐计 1 摩尔当量膦腈碱进行处理时, 最好在水含量低于 0.3% 时进行处理。

[0051] 所述膦腈类碱优选地是下式的碱:

[0052]



[0053] 式中, R_1 - R_7 基可以相同或不同, 代表含有 1-6 个碳原子的直链、支链或环状烷基, 适当时, R_3 和 R_4 可以与它们带有的基团 -N-P-N- 形成 6 元杂环。特别优选, 本发明的目的是如前面定义的方法, 其特征在于解聚步骤 d) 使用的碱是 2-叔丁基亚氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基全氢-1,3,2-二氮杂磷杂苯 (phosphorine (磷杂苯); 正式命名: 2-[(1,1-二甲基乙基)亚氨基]-N,N-二乙基-1,2,2,2,3,5,6-八氢-1,3-二甲基-1,3,2-二氮杂磷杂苯-2-胺)。

[0054] 在温度约 15-25°C 下, 优选地通过过量苯索氯铵与 HTBPM 钠反应进行盐交换步骤 a) 反应。最好盐 / 肝素钠的摩尔比是 2.5-3.5。

[0055] 优选在含氯有机溶剂 (例如氯仿或二氯甲烷) 中, 在温度 25-45°C, 优选 30-40°C 下进行步骤 b) 的酯化。然后, 使用 10 重量% 乙酸钠在例如甲醇的醇中溶液沉淀回收呈钠盐形式的酯。一般而言, 每反应介质体积使用 1-1.2 体积的醇。调整苄基氯的量和反应时间使酯化率达到 40-100%, 优选地 70-90%。优选每 1 重量份肝素苄乙铵盐使用 0.5-1.5 重量份苄基氯。还优选反应时间是 10-35h。

[0056] 因此, 本发明方法达到的肝素苄酯季铵盐酯化率是 40-100%, 优选 70-90%。

[0057] 一般而言, 在温度 15-25°C 下, 使用一种乙酸钠醇溶液, 优选使用 10% (重量 / 体积) 乙酸钠甲醇溶液处理这种反应介质, 可使解聚的肝素苄酯季铵盐转化成钠盐。

[0058] 添加乙酸盐的重量当量优选为随后在解聚反应中使用的肝素苄酯季铵盐的量的 3 倍。得到的 HTBPM 苄酯季铵盐优选是苄乙铵盐、鲸蜡基吡啶鎓或鲸蜡基三甲基铵盐。

[0059] 在含水介质中, 在温度 10-25°C 下, 使用氯化季铵, 优选使用苯索氯铵、鲸蜡基吡啶鎓或鲸蜡基三甲基铵盐进行步骤 c) 的盐交换反应。氯化季铵 / 肝素苄酯钠盐的摩尔比最好是 2.5-3.5。

[0060] 一般地, 在含水介质中, 在温度 0-20°C, 优选 0-10°C 下, 使用碱金属氢氧化物, 例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂进行皂化反应。一般而言, 使用 1-5 摩尔当量的碱金属氢氧化物。优选在 1-2 摩尔当量的碱金属氢氧化物存在下进行皂化反应。

[0061] 任选采用任何已知的纯化解聚肝素的方法来纯化最终产物 (例如根据 EP 0037319B1 中所述的方法)。优选在含水介质中, 在温度 10-50°C 下, 使用过氧化氢进行纯化。优选该操作在 20-40°C 下进行。

[0062] 可以将呈钠盐形式的本发明混合物转化成其它碱金属或碱土金属盐形式。采用在专利 FR 73 13 580 中描述的方法, 可任选地将一种盐转化成另一种盐。

[0063] 本发明使得六糖 Δ IIa-II_S-Is 大大富集。本技术领域的技术人员熟知,采用产生低分子量肝素的方法而使其肝素再解聚时,得到产物的抗 Xa 活性急剧下降,甚至是零。在采用能够获得依诺肝素、弗希肝素 (fraxiparine)、替地肝素 (fragmine)、亭扎肝素钠 (innohep) (或洛集帕林 (logiparin))、阿地肝素钠 (normiflo)、Embollex (或 Sandoparin)、Fluxum (或 Minidaltol)、瑞维肝素 (clivarine) 和 Hibor 的方法的情况下,如果使用它们的原方法使这些 HBPM 再解聚时就可以观察到这种现象。这是由于这些方法保存对位点 ATIII 低选择性所致。

[0064] 在本发明中,如果使用来自胰解聚方法的 HTBPM 作为原料,必然发生其反现象。寡糖混合物的 aXa 活性增加并甚至超过用于制备 HTBPM 的肝素的活性。这可以是由于胰碱保存对 ATIII 具有亲合性的序列的显著选择性所致。

[0065] 通过得到寡糖混合物的平均分子量也可观察到该方法的这个特征。例如,使平均分子量 2400 道尔顿的 HTBPM 解聚时,得到 2000Da 平均分子量的寡糖混合物。观察到,防止对 ATIII 有亲合性的序列 (六糖和八糖) 受到胰碱的作用,这样会使其它序列受到破坏并被除去,因此,得到了趋向于未解聚组成部分平均分子量的平均分子量的产物;即六糖 Δ Ha-II_S-Is (1834g/mol)。应该指出,在用胰碱解聚肝素步骤中,平均分子量从约 15000Da 到约 2400Da。

[0066] 另外,本发明的方法能够增加因子 Xa 的活性和选择性,该方法也可应用于一般低分子量肝素。例如,作为示例可以列举依诺肝素、弗希肝素、替地肝素、亭扎肝素钠 (或洛集帕林)、阿地肝素钠、Embollex (或 Sandoparin)、Fluxum (或 Minidaltol)、瑞维肝素和 Hibor。还可能涉及某些具有抗 Xa 活性的非常低分子量肝素,例如在 US 6 384 021 (2000-4000Da) 或 WO 02/08295 (1500-3000Da) 中描述的这些肝素,它们的抗 Xa 活性低于 140UI/mg (具体地 100-140UI/mg)。

[0067] 该方法的这个特征表现在平均分子量的寡糖混合物获得出乎意料的抗 Xa 活性 ($190\text{UI/mg} < \text{aXa} < 450\text{UI/mg}$; $1800\text{Da} < \text{PM} < 2400\text{Da}$)。

[0068] 根据本发明的一个具体实施方式,除去二糖和四糖部分 (这些部分并不特效与 ATIII 结合) 时,也可以增加寡糖混合物对因子 Xa 的选择性。在这种情况下,这种混合物用装有聚丙烯酰胺琼脂糖类凝胶或聚丙烯酰胺凝胶柱进行层析分离。这种混合物用碳酸氢钠溶液洗脱。优选碳酸氢钠溶液是一种 0.1-1mol/l 溶液。还更优选在浓度 1mol/l 进行这种分离。采用紫外光谱测定法 (254nm) 进行这种检测。在除去二糖和四糖部分后,用冰乙酸中和寡糖的碳酸氢钠溶液混合物。这种溶液再减压浓缩得到浓度高于 20 重量%的乙酸钠溶液。加入 3-5 个体积的甲醇沉淀这种寡糖混合物。然后采用过滤回收高亲合寡糖混合物。如果必要,可以使用适当柱脱盐进行纯化。实施例 6 说明了这种可选择方法,得到了非常低分子量的肝素,其抗 Xa 活性高于 400UI/mg。

[0069] 因此,本发明的另一个目的是如前面定义的制备寡糖混合物的方法,它对 Xa 因子具有增加的选择性,其特征在于还采用层析法除去二糖和四糖部分,特别是使用装填聚丙烯酰胺琼脂糖类凝胶柱层析法除去二糖和四糖部分。

[0070] 本发明的混合物可以用作药品。

[0071] 本发明的寡糖混合物可以用作抗凝血剂。特别是它们可有效用于治疗或预防静脉和动脉血栓形成、深静脉血栓形成、肺栓塞、不稳定心绞痛、心肌梗死、心肌缺血、外周动脉

闭塞性疾患和心房纤颤。它们还用于预防和治疗平滑肌细胞增生、动脉粥样硬化和动脉硬化,通过调整血管发生和生长因子用于治疗 and 预防癌症,以及用于治疗 and 预防糖尿病,例如糖尿病性视网膜病和糖尿病性肾病。

[0072] 本发明还涉及含有任选与一种或多种惰性赋形剂结合的式 (I) 混合物作为活性组分的药物组合物。

[0073] 这些药物组合物例如是皮下或静脉注射液。还可以通过肺(吸入)或口服用药途径使用本发明的其它药物组合物。

[0074] 剂量可以随病人的年龄、体重和身体状况而改变。对于成年人,其剂量一般是通过肌肉内或皮下途径用药,每天 20-100mg。

[0075] 下面实施例说明本发明而不是限制其发明。

[0076] 制备 1:获得非常低分子量的肝素,其起始 aXa 活性等于 158.8IU/mg

[0077] 根据专利申请 WO 2004/033503 使用肝素钠,同时采用如前面所述步骤 a-f,可制备出实施例 1 作为起始产品使用的非常低分子量肝素 (HTBPM),在 2-丁基亚氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基全氢-1,3,2-二氮杂磷杂苯存在下,在百分数低于 0.6% 的水存在下进行所述解聚步骤。

[0078] 得到的非常低分子量肝素的特征

[0079] 如此得到的解聚肝素特征如下:

[0080] 平均分子量:2400 道尔顿

[0081] 抗 Xa 活性:158.8UI/mg

[0082] 抗 IIa 活性:3.1UI/mg

[0083] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比:51

[0084] 制备 2:获得非常低分子量的肝素,其起始 aXa 活性等于 158IU/mg

[0085] 根据专利申请 WO 2004/033503 使用肝素钠,同时采用如前所述的步骤 a-f,可制备出实施例 2、3、4、5 作为起始产品使用的非常低分子量肝素 (HTBPM),在 2-叔丁基亚氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基全氢-1,3,2-二氮杂磷杂苯存在下,在百分数低于 0.6% 的水存在下进行该解聚步骤。

[0086] 得到的非常低分子量肝素的特征

[0087] 如此得到的解聚肝素特征如下:

[0088] 平均分子量:2450 道尔顿

[0089] 抗 Xa 活性:158UI/mg

[0090] 抗 IIa 活性:2.1UI/mg

[0091] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比:75

[0092] 制备 3:HTBPM,苄乙铵盐

[0093] HTBPM 转变成苄乙铵盐的盐交换反应(相应于所述方法的步骤 a)):

[0094] 将 12.53g (20.7mmol) 根据制备 1 得到的 HTBPM 钠盐装入 500ml 锥形烧瓶 A 中,并且用 85ml 水溶解(黄色溶液)。

[0095] 将 31.62g (70.5mmol) 苄索氯铵装入有 250ml 水的 100ml 锥形烧瓶 B 中(无色溶液)。

[0096] 将 B 的内容物倒入 A 中,该混合物在室温下搅拌约 1h。接着沉降约 1h。弃去上清

液,然后加入同样体积的水(250ml)。再搅拌约15min,并沉降约30min。弃去上清液,然后加入同样体积的水(250ml)。该混合物搅拌约15min,然后过滤。滤饼用水洗涤3次,每次200ml。湿的米色固体经脱水后在减压(6kPa)炉中在80℃干燥约18h。得到35.56g HTBPM 苄乙铵盐。

[0097] 产率达到89%。

[0098] 制备4:

[0099] HTBPM 转变成苄乙铵盐的盐交换反应(相应于所述方法的步骤a)):

[0100] 将17.93g(30.2mmol)根据制备2得到的HTBPM 钠盐装入1l 锥形烧瓶A中,并且用120ml 水溶解(黄色溶液)。

[0101] 将45g(0.1mol) 苯索氯铵装入有360ml 水的500ml 锥形烧瓶B中(无色溶液)。

[0102] 将B的内容物倒入A中,该混合物在室温下搅拌约1h。接着沉降约1h。弃去上清液,然后加入同样体积的水(500ml)。再搅拌约15min,并沉降约30min。弃去上清液,然后再加入同样体积的水(500ml)。该混合物搅拌约15min,然后过滤。滤饼用水洗涤3次,每次200ml。湿的米色固体经脱水后在减压(6kPa)炉中在80℃干燥约48h。得到49.5g HTBPM 苄乙铵盐。

[0103] 产率达到87%。

[0104] 实施例1:

[0105] 采用本发明方法得到非常低分子量的肝素(HTBPM),该方法包括一个77%酯化的步骤和一个在无水介质中使用由膦腈衍生的碱的解聚步骤。

[0106] HTBPM 的酯化(所述方法的步骤b):

[0107] 将35.39g(18.3mmol)根据制备3得到的HTBPM 苄乙铵盐(水含量0.20%)溶于183.3g 无水二氯甲烷中,再装入500ml 三颈瓶中。在温度30℃下添加29.5ml(25.7mmol) 苄基氯。在30℃反应约23h后的酯化率是77%。在冷却到室温(22±3℃)后,将反应混合物倒入490ml 10%乙酸钠甲醇溶液中。该混合物在室温下搅拌约1h。接着沉降约1h。弃去上清液,然后加入同样体积的甲醇(250ml)。再搅拌约30min,并沉降约45min。弃去上清液,然后加入同样体积的甲醇(250ml)。接着沉降约16h。弃去上清液,然后加入同样体积的甲醇(350ml)。该混合物搅拌约5min,然后过滤其悬浮液。滤饼用水洗涤2次,每次50ml,脱水然后在减压(6kPa)与40℃下干燥约18h。得到34.48g 粗制HTBPM 苄酯钠盐,酯化率达到77%。

[0108] HTBPM 苄酯钠盐的纯化(所述方法的步骤b)):

[0109] 将34.48g 粗制HTBPM 苄酯钠盐溶于350ml 10% NaCl 水溶液中。将这种溶液倾至1.57l 甲醇中。该悬浮液搅拌约40min,接着沉降约16h。弃去上清液,然后加入同样体积的甲醇(1.5l)。再搅拌约1h,并沉降约1.5h。弃去上清液,然后加入同样体积的甲醇(1.2l)。该混合物搅拌约15min,然后过滤。滤饼用甲醇洗涤3次,每次50ml。白色的湿固体脱水然后在减压(6kPa)与40℃干燥约18h。得到6.07g HTBPM 苄酯钠盐。

[0110] 酯化率达到50%。

[0111] HTBPM 苄酯钠盐转变成苄乙铵钠的盐交换反应(所述方法的步骤c)):

[0112] 在250ml 锥形烧瓶A中用40ml 水溶解6g(9.14mmol)HTBPM 苄酯钠盐。

[0113] 同时,将13.93g(31mmol) 苯索氯铵与110ml 水装入250ml 锥形烧瓶B中。

[0114] 将 B 的内容物倒入 A 中。该悬浮液在室温 ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) 下搅拌约 1h, 接着沉降约 1h。弃去上清液, 然后加入同样体积的水 (140ml)。再搅拌约 15min, 并沉降 1h。弃去上清液, 然后加入同样体积的水 (140ml)。该混合物搅拌约 15min, 接着沉降约 30min。弃去上清液, 然后加入同样体积的水 (140ml) 换。搅拌约 5min, 然后过滤。滤饼用水洗涤 3 次, 每次 50ml, 脱水后在减压 (6kPa) 与 80°C 干燥约 18h。得到 17.43g HTBPM 苄酯苄乙铵盐。

[0115] 产率达到 100%。

[0116] 在无水介质中 HTBPM 苄酯苄乙铵盐解聚: 水含量检测不到 $< 0.01\%$ (所述方法的步骤 d))

[0117] 将制备 2 的 17.43g (9.14mmol) HTBPM 装入有 122ml 无水二氯甲烷的 250ml 三颈烧瓶中。添加 17.4g **4A** 分子筛。在氩气气氛下在室温 ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) 搅拌约 18h。

[0118] 将这种溶液转移到 250ml 三颈烧瓶中, 将该分子筛与混合物分离。添加 2.64ml (9.14mmol) 2-叔丁基亚氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基全氢-1,3,2-二氮杂磷杂苯, 在氩气气氛下在 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 搅拌 24h。

[0119] 季铵盐转化成钠盐 (所述方法的步骤 e))

[0120] 同时, 在 21 锥形烧瓶中制备 730ml 10% 乙酸钠甲醇溶液。向这个溶液中添加 8.71g Hyflo supercel 硅藻土。将这种反应混合物倒入所述甲醇溶液中, 同时保持温度约 4°C 。该悬浮液在这个温度下搅拌约 15min。接着在室温下沉降约 45min, 然后弃去上清液, 然后加入同样体积的甲醇 (450ml)。再搅拌约 15min, 并沉降 45min。再弃去上清液, 然后加入同样体积的甲醇 (420ml)。搅拌约 15min, 接着用 3 号烧结玻璃过滤器过滤。滤饼用甲醇洗涤 2 次, 每次 70ml, 脱水后在减压 (6kPa) 与 50°C 干燥约 18h。得到 4.35g 在硅藻土 (8.71g) 中的粗制解聚 HTBPM (钠盐)。

[0121] 产率达到 72.5%。

[0122] 粗制解聚 HTBPM (钠盐) 的皂化 (所述方法的步骤 f1)) :

[0123] 4.35g (6.63mmol) 在硅藻土中的粗制解聚 HTBPM (钠盐) 溶于 46ml 水中, 然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤。硅藻土用 2 份水漂洗, 每份 30ml。将滤饼装入 500ml 锥形烧瓶中。在温度约 4°C 下加入 $823 \mu\text{l}$ (9.94mmol) 35% 氢氧化钠溶液。在这个温度下搅拌约 3h。其介质加入 1N HCl 溶液进行中和, 然后添加 11.5g NaCl 和 80ml 甲醇。在搅拌约 15min 后, 添加 210ml 甲醇。该悬浮液搅拌约 1h, 然后接着沉降 30min。弃去上清液, 加入同样量的甲醇 (230ml)。搅拌约 15min, 再接着沉降 30min。弃去上清液, 加入同样量的甲醇 (210ml)。搅拌约 15min, 然后过滤。滤饼用甲醇洗涤 2 次, 每次 9ml, 脱水, 然后在减压 (6kPa) 与 50°C 下干燥约 18h。得到 2.95g 粗制解聚 HTBPM (钠盐)。

[0124] 产率达到 73.7%。

[0125] 粗制解聚 HTBPM (钠盐) 的纯化 (所述方法的步骤 f2)) :

[0126] 将 1.5g 粗制解聚 HTBPM 钠盐装入有 16ml 水的 50ml 三颈烧瓶中。该溶液在约 10min 内升温到 40°C 。通过加入 0.1N 氢氧化钠将 pH 调到约 9.7。该溶液先用 $0.45 \mu\text{m}$ 膜过滤, 然后添加 $84 \mu\text{l}$ 30% 过氧化氢水溶液。该混合物在室温下搅拌 2h, 同时通过加入 0.1N 氢氧化钠将 pH 保持在 9.7 ± 0.1 不变。该反应混合物然后用 0.1N HCl 中和, 再添加 2g NaCl。在搅拌约 10min 后, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 膜过滤该溶液。在温度约 4°C 下倒入 14ml 甲醇。该溶液在室温下搅拌约 15min。然后添加 36ml 甲醇, 该悬浮液搅拌约 1h。这时停止搅拌, 接着沉降

约 30min。然后抽取其上清液弃去 (40ml)。向沉降的沉淀添加 40ml 甲醇, 搅拌约 10min。使其沉淀再沉降约 30min。抽取其上清液弃去 (45ml)。添加 45ml 甲醇, 然后过滤处于悬浮状态的沉淀。得到的白色滤饼再用 2 份甲醇洗涤, 每份 3ml 甲醇。湿的固体经脱水后在温度约 50℃ 与减压 (6kPa) 下干燥。在干燥约 18h 后, 得到 1.303g 纯解聚的 HTBPM (钠盐)。

[0127] 产率达到 86.8%。

[0128] 如此得到的解聚 HTBPM 的特征

[0129] 平均分子量 :1950 道尔顿

[0130] 多分散性指数 :1.1

[0131] 抗 Xa 活性 :283U/mg

[0132] AIIa 活性 :未检测到 (< 0.2U/mg)

[0133] 实施例 2:

[0134] 采用本发明方法得到非常低分子量肝素 (HTBPM), 该方法包括一个 49% 酯化的步骤和一个在无水介质中使用一种由磷脂衍生的碱的解聚步骤。

[0135] HTBPM 的酯化 (所述方法的步骤 b):

[0136] 将 13.29g (7.6mmol) 根据制备 4 得到的 HTBPM 苄乙铵盐溶于 70.43g 无水二氯甲烷中, 再到 100ml 三颈烧瓶中 (反应介质的水含量是 0.073%)。在温度 30℃ 下, 添加 12.3ml (107mmol) 苄基氯。在 30℃ 反应约 7h 后酯化率是 49%。冷却后, 将该反应混合物倒入 160ml 12% 乙酸钠甲醇溶液中。该混合物在室温下搅拌 1h, 然后使其沉降约 16h。弃去上清液, 然后加入相同体积甲醇 (100ml)。搅拌约 1h, 接着沉降约 1h。再弃去其上清液, 加入相同体积甲醇 (100ml)。搅拌约 5min, 然后过滤。滤饼用 2×40ml 甲醇洗涤, 脱水, 然后在减压 (6kPa) 与 40℃ 炉中干燥约 18h。得到 3.90g 粗制 HTBPM 苄酯钠盐, 酯化率是 49%。

[0137] HTBPM 苄酯 (49% 酯化) 钠盐的纯化 (所述方法的步骤 b)。

[0138] 将 3.90g 粗制 HTBPM 苄酯钠盐溶于 39ml 10% NaCl 水溶液中。将该溶液倒入 176ml 甲醇中。该悬浮液搅拌约 15min, 然后接着沉降 2h。过滤该混合物。滤饼在 175ml 甲醇中再制成悬浮液, 搅拌 10min。过滤, 滤饼用 2 份甲醇洗涤, 每份 10ml。白色的湿固体脱水后, 在减压 (6kPa) 与 40℃ 炉中干燥约 18h。得到 2.62g HTBPM 苄酯钠盐。

[0139] 酯化段的总产率达到 57.3%。

[0140] HTBPM 苄酯转化成苄乙铵盐的盐交换反应 (所述方法的步骤 c)):

[0141] 将 2.62g (4.37mmol) HTBPM 苄酯钠盐溶于 20ml 水中 (锥形烧瓶 A)。同时, 将 5.92g (13.2mmol) 苄索氯铵与 60ml 水装入锥形烧瓶 B 中。将“B”的内容物倒入“A”中。该悬浮液在室温下搅拌约 1h, 然后接着沉降 1h。弃去上清液, 加入相同体积水 (70ml)。搅拌约 15min, 接着沉降 1h。再弃去上清液, 加入相同体积水 (70ml)。再搅拌约 5min, 过滤。滤饼用 3 份水洗涤, 每份 50ml, 脱水然后在减压 (6kPa) 与 80℃ 炉中干燥约 18h。得到 6.85g HTBPM 苄酯苄乙铵盐。

[0142] 产率达到 99%。苄乙铵盐中的水含量是 0.6%。

[0143] HTBPM 苄酯苄乙铵盐的解聚作用:

[0144] 将 6.80g (4.3mmol) HTBPM 装入有 54ml 无水二氯甲烷的 100ml 三颈烧瓶中。该混合物升温到 30℃, 然后搅拌直到完成溶解。估算反应混合物的水含量是约 0.05%。添加 1.25ml (4.3mmol) 2-叔丁基亚氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基全氢-1,3,2-二氮杂磷杂

苯,在惰性气氛下于 30℃搅拌 24h。

[0145] 季铵盐转变成钠盐(所述方法的步骤 e))

[0146] 同时,在 11 锥形烧瓶中制备 270ml 10%乙酸钠甲醇溶液。将该反应混合物倒入所述甲醇溶液中,同时将温度保持在约 4℃。该悬浮液在室温下搅拌约 1h。接着沉降 1h。弃去上清液,然后加入同样量的甲醇(165ml)。搅拌约 1h,再接着沉降 1h。再弃去其上清液,加入同样量的甲醇(170ml)。搅拌约 15min 并过滤。滤饼用 3 份甲醇洗涤,每份 40ml,脱水,然后在减压(6kPa)与 50℃炉中干燥约 18h。得到 2.29g 粗制解聚 HTBPM 钠盐。

[0147] 产率达到 89%。

[0148] 粗制 HTBPM 钠盐的皂化作用(所述方法的步骤 f1));

[0149] 将 2.29g(3.8mmol)粗制解聚 HTBPM 钠盐溶于 23ml 水中。用 0.8 μm 膜过滤该溶液,然后装入 100ml 三颈烧瓶中。在温度约 3℃下加入 575 μl(5.73mmol)30%氢氧化钠溶液。在这个温度下搅拌约 2h。

[0150] 向一半的反应混合物加入冰醋酸进行中和,然后添加 367mg 固体乙酸钠和 13ml 甲醇。该溶液搅拌约 15min,然后添加 65ml 甲醇。得到的悬浮液搅拌约 30min,然后接着沉降约 16h。弃去上清液,加入同样量的甲醇(36ml)。再搅拌约 30min,然后接着沉降约 30min。弃去上清液,加入同样量的甲醇(16ml)。搅拌约 15min 并用 0.22 μm 膜过滤。滤饼用甲醇洗涤 2 次,每次 5ml,脱水,然后在减压(6kPa)与 50℃炉中干燥约 18h。得到 563mg 粗制解聚 HTBPM(钠盐)。

[0151] 产率达到 52.6%。

[0152] 用 AcONa 沉淀粗制解聚 HTBPM(钠盐)进行纯化(所述方法的步骤 f2));

[0153] 将 560mg 粗制解聚 HTBPM(钠盐)装入有 5.6ml 水的 10ml 三颈烧瓶中。褐色溶液在 10min 升温到 40℃。通过加入 0.1N 氢氧化钠将 pH 调到 9.7。该溶液用 0.45 μm 膜过滤,添加 28 μl 30%过氧化氢水溶液。该混合物在室温下搅拌 2h,同时通过加入 0.1N 氢氧化钠使 pH 9.5±0.1 保持不变。该反应混合物用 0.1N HCl 进行中和,添加 620mg NaCl。搅拌 10min 后,该溶液用 0.45 μm 膜过滤。在温度约 4℃下倒入 4.35ml 甲醇中。该溶液在室温下搅拌 15min。添加 11.2ml 甲醇。该悬浮液搅拌 1h。这时停止搅拌,再接着沉降 1h。然后抽取其上清液弃去(13.5ml)。向沉降的沉淀添加 13.5ml 甲醇,搅拌 15min。该沉淀继续再沉降约 30min。抽取其上清液弃去(13ml)。添加 13ml 甲醇,然后过滤呈悬浮状的沉淀。得到的白色滤饼然后用 2 份甲醇洗涤,每份 5ml。湿的固体脱水后在减压(6kPa)与温度 50℃下进行干燥。干燥 18h 后,得到 376mg 纯解聚 HTBPM(钠盐)。产率达到 67%。

[0154] 如此得到的解聚 HTBPM 特征如下:

[0155] 抗 Xa 活性:191UI/mg

[0156] 平均分子量:2100Da

[0157] 实施例 3:

[0158] 根据本发明方法得到非常低分子量肝素(HTBPM),该方法包括一个 73%酯化的步骤和一个在无水介质中使用由膦腈衍生的碱的解聚步骤。

[0159] HTBPM 的酯化(所述方法的步骤 b));

[0160] 将 13.7g(7.3mmol)根据制备 4 得到的 HTBPM 苄乙铵盐溶于 73.67g 无水二氯甲烷中,并装入 100ml 三颈烧瓶中。(测定反应介质的水含量为 0.23%)。在温度 30℃下添

加 13ml (113mmol) 苄基氯。在 30℃ 反应约 20h 后酯化率达到 73%。冷却到室温后,将该反应混合物倒入 210ml 12% 乙酸钠甲醇溶液中。该混合物在室温下搅拌 30min,然后接着沉降约 1.5h。弃去上清液,然后加入相同体积的甲醇 (140ml)。搅拌 15min,过滤该悬浮液。滤饼用两份甲醇洗涤,每份 100ml,脱水,然后在减压 (6kPa) 与 40℃ 炉中干燥约 18h。得到 13.3g 粗制 HTBPM 苄酯钠盐,酯化率是 73%。

[0161] HTBPM 苄酯 (酯化 73%) 钠盐的纯化 (所述方法的步骤 b)

[0162] 将 13.3g 粗制 HTBPM 苄酯钠盐溶于 133ml 10% NaCl 水溶液中。将该溶液倒入 600ml 甲醇中。该悬浮液搅拌约 15min,然后任其沉降约 1h。弃去上清液,然后加入相同体积的甲醇 (400ml)。搅拌约 5min,然后过滤。滤饼用甲醇洗涤 3 次,每次 100ml。湿的白色固体脱水后在减压 (6kPa) 与 40℃ 炉中干燥约 18h。得到 2.33g HTBPM 苄酯钠盐。

[0163] 酯化率达到 49.6%。

[0164] HTBPM 苄酯苄乙铵盐的盐交换反应 (所述方法的步骤 c):

[0165] 在 100ml 锥形烧瓶“A”中使用 15ml 水溶解 2.27g (3.53mmol) HTBPM 苄酯钠盐。同时,将 5.22g (11.6mmol) 苄索氯铵与 55ml 水装入 100ml 锥形烧瓶“B”中。

[0166] 将“B”中的内容物倒入“A”中。该悬浮液在室温下搅拌约 1h,然后接着沉降约 1h。弃去上清液,加入相同体积的水 (50ml)。搅拌约 15min,再接着沉降约 1h。弃去上清液,加入相同体积的水 (50ml)。再搅拌 5min,然后过滤。滤饼用 3 份水洗涤,每份 50ml,脱水后在减压 (6kPa) 与 80℃ 炉中干燥约 18h。得到 5.67g HTBPM 苄酯苄乙铵盐。

[0167] 产率达到 98%。所得到的水含量是 1%。

[0168] HTBPM 苄酯苄乙铵盐解聚作用 (所述方法的步骤 d):

[0169] 将 5.45g (3.3mmol) HTBPM 装入有 40ml 无水二氯甲烷的 100ml 三颈烧瓶中。估算混合物的水含量是约 0.1%。将该混合物升温到 30℃。添加 958 μ l (3.3mmol) 2-叔丁基氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基全氢-1,3,2-二氮杂磷杂苯,在氩气气氛下在 30℃ 搅拌 24h。

[0170] 季铵盐转变成钠盐 (所述方法的步骤 e)):

[0171] 同时,在 500ml 锥形烧瓶中制备 200ml 10% 乙酸钠甲醇溶液。将该反应混合物倒入所述甲醇溶液中,同时将温度保持在约 4℃。该悬浮液在室温下搅拌约 1h。接着沉降约 1h。弃去上清液,然后加入相同量的甲醇 (150ml)。搅拌约 30min,再接着沉降约 30min。再弃去其上清液,加入同样量的甲醇 (150ml)。搅拌约 15min,然后过滤。滤饼用甲醇洗涤 3 次,每次 50ml,脱水后在减压 (6kPa) 与 50℃ 下干燥约 18h。得到 1.40g 粗制解聚 HTBPM 钠盐。产率达到 65.8%。

[0172] 粗制解聚 HTBPM 钠盐的皂化 (所述方法的步骤 f1):

[0173] 将 1.40g (2.18mmol) 粗制解聚 HTBPM (钠盐) 溶于 14ml 水中。将该溶液装入 100ml 三颈圆底烧瓶中。在温度约 4℃,加入 351 μ l (3.5mmol) 30% 氢氧化钠溶液。在这个温度下搅拌约 2h。加入冰醋酸 (100%) 中和该溶液,然后添加 7g 固体乙酸钠和 130ml 甲醇。该悬浮液搅拌 30min,然后接着沉降约 1h。弃去上清液,加入同样量的甲醇 (80ml)。再搅拌约 30min,接着沉降约 16h。弃去上清液,加入同样量的甲醇 (80ml)。搅拌约 15min,然后用 0.45 μ m 膜过滤。滤饼用甲醇洗涤 2 次,每次 10ml,脱水后在减压 (6kPa) 与 50℃ 下干燥约 18h。得到 1.15g (产率:89.4%) 粗制解聚 HTBPM (钠盐)。

[0174] 产率达到 89.4%。

[0175] 粗制解聚 HTBPM(钠盐)纯化(所述方法的步骤 f2):

[0176] 373mg 粗制解聚 HTBPM(钠盐)装入有 3.7ml 水的 10ml 三颈烧瓶中。该溶液在 10min 升温到 40℃。通过加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调到约 9.5。该溶液用 0.45 μm 膜过滤,然后添加 18 μl 30%过氧化氢水溶液。该混合物在室温下搅拌约 2h,同时加入 0.1N 氢氧化钠使 pH 9.5±0.1 保持不变。该反应混合物用 0.1N HCl 中和,然后添加 430mg NaCl。搅拌约 10min 后,该溶液用 0.45 μm 膜过滤。在温度约 4℃倒入 3ml 甲醇。该溶液在室温下搅拌 15min。然后添加 7.7ml 甲醇。该悬浮液搅拌约 1h。这时停止搅拌,接着沉降约 40min。然后抽取其上清液弃去(10ml)。向沉降的沉淀添加 10ml 甲醇,搅拌 15min。使其沉淀再沉降约 30min。抽取其上清液弃去(10ml)。添加 10ml 甲醇,用 0.45 μm 膜过滤呈悬浮状的沉淀。得到的白色滤饼用 4 份甲醇洗涤,每份 5ml。湿的固体在脱水后在减压(6kPa)与温度约 50℃下进行干燥。在干燥约 18h 后,得到 199mg 纯解聚的 HTBPM(钠盐)。产率达到 54%。

[0177] 如此得到的解聚 HTBPM 的特征如下:

[0178] 平均分子量:2000 道尔顿。多分散性指数:1.1

[0179] 抗 Xa 活性:252UI/mg

[0180] 实施例 4:

[0181] 采用本发明的方法得到 HTBPM,该方法包括一个 96%酯化的步骤和一个采用 BEMP 的解聚步骤。

[0182] HTBPM 的酯化(所述方法的步骤 b))

[0183] 将 14.45g(7.7mmol)根据制备 4 得到的 HTBPM 苄乙铵盐溶于 75.79g 无水二氯甲烷中,再装入 250ml 三颈烧瓶中。(反应介质的水含量是 0.20%)。在温度 30℃下添加 12.4ml(108mmol)苄基氯。在温度 30℃反应约 26h 后的酯化率是 96%。冷却到室温后,将该反应混合物倒入 180ml 12%乙酸钠甲醇溶液中。该混合物在室温下搅拌约 30min,然后接着沉降约 30min。弃去上清液,然后加入相同体积的甲醇(150ml)。搅拌约 15min,然后过滤。滤饼用 2 份甲醇洗涤,每份 100ml,脱水后在减压(6kPa)与 40℃下干燥约 18h。得到 3.67g 粗制 HTBPM 苄酯钠盐,酯化率 96%。

[0184] HTBPM 苄酯(酯化 96%)钠盐的纯化(所述方法的步骤 b)):

[0185] 将 3.67g 粗制 HTBPM 苄酯钠盐溶于 37ml 10% NaCl 水溶液(3.7g NaCl 在 37ml 水中的溶液)中。将该溶液倒入 167ml 甲醇中。该悬浮液搅拌约 15min,然后接着沉降约 1h。弃去上清液,然后加入相同体积的甲醇(38ml)。搅拌约 5min 并过滤。滤饼用甲醇洗涤 2 次,每次 30ml。湿的白色固体经脱水后在减压(6kPa)与 40℃下干燥约 18h。得到 2.76g HTBPM 苄酯钠盐。

[0186] 酯化率达到 54.4%。

[0187] HTBPM 苄酯转化成苄乙铵盐的盐交换反应(所述方法的步骤 c)):

[0188] 在 100ml 锥形烧瓶“A”中使用 20ml 水溶解 2.83g(4.29mmol)HTBPM 苄酯钠盐。同时,将 6.35g(14.2mmol)苯索氯铵和 50ml 水装入 100ml 锥形烧瓶“B”中。

[0189] 将“B”内容物倒入“A”中。该悬浮液在室温下搅拌约 1h,然后接着沉降约 1h。弃去上清液。加入相同体积的水(60ml)。搅拌约 15min,再接着沉降约 1h。弃去上清液,加入相同体积的水(60ml)。再搅拌约 5min,然后过滤。滤饼用水洗涤 4 次,每次 50ml,脱水后在

减压 (6kPa) 与 80℃ 下干燥约 18h。得到 7.0g HTBPM 苄酯苄乙铵盐。

[0190] 测得的产率是约 100%。水含量是 0.23%。

[0191] HTBPM 苄酯苄乙铵盐的解聚 (所述方法的步骤 d)):

[0192] 将 3.67g (2.3mmol) HTBPM 装入有 27ml 无水二氯甲烷的 50ml 三颈圆底烧瓶中。该混合物升温到 30℃。添加 676 μ l (2.3mmol) 2-叔丁基亚氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基全氢-1,3,2-二氮杂磷杂苯, 在 30℃ 搅拌 24h。

[0193] 季铵盐转变成钠盐 (所述方法的步骤 e))

[0194] 同时, 在 250ml 锥形烧瓶中制备 150ml 10% 乙酸钠甲醇溶液。将该反应混合物倒入其甲醇溶液中, 同时将温度保持在约 4℃。该悬浮液在室温下搅拌约 1h。接着沉降约 1h。弃去上清液, 然后加入同样量的甲醇 (100ml)。搅拌 30min, 再接着沉降 30min。再弃去其上清液, 加入同样量的甲醇 (100ml)。搅拌 15min 并过滤。滤饼用甲醇洗涤 3 次, 每次 40ml, 脱水, 在减压 (6kPa) 与 50℃ 下干燥约 18h。得到 966mg 解聚 HTBPM 钠盐。

[0195] 产率达到 64%。

[0196] HTBPM 苄酯钠盐的皂化 (所述方法的步骤 f1)):

[0197] 将 942mg (1.43mmol) 解聚 HTBPM 钠盐溶于 9.5ml 水中。将该溶液装入 100ml 三颈圆底烧瓶中。在温度约 4℃ 下加入 236 μ l (2.35mmol) 30% 氢氧化钠溶液。在这个温度下搅拌约 2h。加入冰醋酸 (100%) 中和该溶液。然后添加 4.5g 固体乙酸钠和 85ml 甲醇。该悬浮液搅拌约 30min, 然后接着沉降约 1h。弃去上清液, 加入同样量的甲醇 (40ml)。再搅拌约 30min, 接着沉降约 16h。弃去上清液, 再加入同样量的甲醇 (40ml)。搅拌约 30min, 用 0.45 μ m 膜过滤。滤饼用甲醇洗涤 2 次, 每次 10ml, 脱水后在减压 (6kPa) 与 50℃ 干燥约 18h。得到 776mg 粗制解聚 HTBPM (钠盐)。

[0198] 产率达到 91.4%。

[0199] 粗制解聚 HTBPM (钠盐) 纯化 - 所述方法的步骤 f2):

[0200] 将 758mg 粗制解聚 HTBPM (钠盐) 装入有 7.6ml 水的 25ml 三颈烧瓶中。该溶液在 10min 升温到 40℃。通过加入 0.1N 氢氧化钠将 pH 调节到约 9.5。该溶液用 0.45 μ m 膜过滤, 然后添加 38 μ l 30% 过氧化氢水溶液。该混合物在室温下搅拌约 2h, 同时通过加入 0.1N 氢氧化钠使 pH 9.5 $\pm$ 0.1 保持不变。该反应混合物用 1N HCl 中和, 添加 880mg NaCl。搅拌约 10min 后, 该溶液用 0.45 μ m 膜过滤。在温度约 4℃ 下倒入 6.2ml 甲醇。该溶液在室温下搅拌约 15min。添加 16ml 甲醇, 该悬浮液搅拌约 1h。这时停止搅拌, 过滤悬浮液。滤饼用 2 份甲醇洗涤, 每份 15ml。湿的固体脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 50℃ 下进行干燥。干燥约 18h 后, 得到 490mg 纯解聚 HTBPM (钠盐)。产率达到 65%。

[0201] 如此得到的解聚 HTBPM 特征如下:

[0202] 平均分子量: 2000 道尔顿

[0203] 多分散性指数: 1.1

[0204] 抗 Xa 活性: 205UI/mg

[0205] 实施例 5:

[0206] 采用本发明的方法得到 HTBPM, 该方法包括一个 96% 酯化的步骤和一个使用叔-丁基亚氨基-三(二甲基氨基)磷烷的解聚步骤。

[0207] HTBPM 苄酯苄乙铵盐的解聚 (所述方法的步骤 d)):

[0208] 将根据实施例 4 得到的 3.67g (2.3mmol) HTBPM 苄酯苄乙铵盐 (酯化 96%), 其中水含量 0.23%, 装入有 30ml 无水二氯甲烷的 50ml 三颈烧瓶中。该混合物升温到 30℃。添加 595 μ l (2.3mmol) 叔丁基亚氨基-三(二甲基氨基)磷烷, 在 30℃ 搅拌 24h。

[0209] 季铵盐转变成钠盐 (所述方法的步骤 e))

[0210] 同时, 在 250ml 锥形烧瓶中制备 160ml 10% 乙酸钠甲醇溶液。将该反应混合物倒入甲醇溶液中, 同时将温度保持在约 4℃。该悬浮液在室温下搅拌约 1h。接着沉降约 1h。弃去上清液, 然后加入同样量的甲醇 (120ml)。搅拌约 30min, 再接着沉降 30min。再弃去其上清液, 加入同样量的甲醇 (125ml)。搅拌约 15min 并过滤。滤饼用甲醇洗涤 3 次, 每次 40ml, 脱水并在减压 (6kPa) 与温度 50℃ 下干燥约 18h。得到 982mg 粗制解聚 HTBPM 钠盐。产率达到 65%。

[0211] 粗制解聚 HTBPM 钠盐的皂化 (所述方法的步骤 f1):

[0212] 将 980mg (1.49mmol) 粗制解聚 HTBPM 钠盐溶于 10ml 水中。再将该溶液装入 100ml 三颈圆底烧瓶中。在温度约 4℃ 下加入 246 μ l (2.45mmol) 30% 氢氧化钠溶液。在这个温度下搅拌约 2h。加入冰醋酸 (100%) 中和该溶液。然后添加 4.9g 固体乙酸钠和 95ml 甲醇。该悬浮液搅拌约 30min, 然后接着沉降约 1h。弃去上清液, 加入同样量的甲醇 (60ml)。再搅拌约 30min, 接着沉降约 16h。弃去上清液, 再加入同样量的甲醇 (60ml)。搅拌约 30min, 用 0.45 μ m 膜过滤。滤饼用甲醇洗涤 2 次, 每次 10ml, 脱水后在减压 (6kPa) 与 50℃ 干燥约 18h。得到 809mg 粗制解聚 HTBPM (钠盐)。

[0213] 产率达到 91.6%。

[0214] 粗制解聚 HTBPM (钠盐) 的纯化 - 所述方法的步骤 f2:

[0215] 将 792mg 粗制解聚 HTBPM (钠盐) 装入有 8ml 水的 25ml 三颈烧瓶中。该溶液在 10min 升温到 40℃。通过加入 0.1N 氢氧化钠将 pH 调节到约 9.5。该溶液用 0.45 μ m 膜过滤, 然后添加 39.6 μ l 30% 过氧化氢水溶液。该混合物在室温下搅拌约 2h, 同时加入 0.1N 氢氧化钠使 pH 9.5 ± 0.1 保持不变。该反应混合物用 1N HCl 中和, 添加 1.04g NaCl。搅拌约 10min 后, 该溶液用 0.45 μ m 膜过滤。在温度约 4℃ 下倒入 7.3ml 甲醇。该溶液在室温下搅拌约 15min。添加 18.8ml 甲醇, 该悬浮液搅拌约 1h。这时停止搅拌, 再过滤。滤饼用 3 份甲醇洗涤, 每份 15ml。湿的固体脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 50℃ 下进行干燥。干燥约 18h 后, 得到 538mg 纯解聚 HTBPM (钠盐)。产率达到 67.9%。

[0216] 如此得到的解聚 HTBPM 特征如下:

[0217] 平均分子量: 2100 道尔顿

[0218] 多分散性指数: 1.1

[0219] 抗 Xa 活性: 209UI/mg

[0220] 实施例 6:

[0221] 采用本发明方法得到 HTBPM, 该方法包括采用层析的补充分离步骤, 同时除去二糖和四糖部分。

[0222] 将实施例 1 描述的寡糖混合物 (286mg) 溶于 20ml 移动相 (0.2mol/l 碳酸氢钠水溶液) 中。

[0223] 这些层析条件如下:

[0224] - 移动相: 0.2mol/l 碳酸氢钠溶液

[0225] - 固定相 :Gel biogel P6

[0226] - 柱 :长度 1m, 直径 5cm。

[0227] - 检测波长 :240nm。

[0228] 收集并合并大于或等于六糖的部分。它们再用乙酸中和, 然后浓缩直到得到 200g/1 乙酸钠溶液。在搅拌下, 向得到的溶液添加 5 个体积甲醇。该悬浮液搅拌约 18h, 然后用 0.45 μ m 膜过滤。滤饼在减压 (6kPa) 与温度约 40°C 下干燥约 6h。得到的产物再进行沉淀, 然后溶于尽可能少量的水中, 并用 Sephadex G10 柱脱盐。在脱盐部分浓缩后, 进行冻干, 得到 109mg 产物。产率达到 38%。

[0229] 如此得到的寡糖混合物特征如下 :

[0230] 抗 Xa 活性 :403UI/mg

[0231] 寡糖百分数如下 :

[0232]

Mw (Da)	多分散性	Di %	Tetra %	Hexa %	Octa %	Deca %	> Deca %
2150	1.0	0	0	53.83	32.58	10.5	3.5

[0233] 本发明化合物的药理学活性 :

[0234]

实施例	平均分子量	抗 Xa 活性 UI/mg	抗 IIa 活性
1	1950	283	< 0.2
2	2100	191	0
3	2000	252	0
4	2000	205	0
5	2100	209	0
6	2150	403	0

[0235] 本发明化合物中六糖 Δ IIa-II_S-Is 的百分数 :

[0236]

实施例	六糖部分百分数	六糖部分中六糖 Δ IIa-II _S -Is 百分数
1	31%	46%
2	30%	26%

实施例	六糖部分百分数	六糖部分中六糖 Δ IIa-II _s -Is 百分数
3	33%	33.5%
4	32%	30.8%
5	31.5%	28.7%
6	53.8%	46%