

申請日期	83.05.07
案 號	83104157
類 別	C08B 37/10 A61K31/115

A4
C4

433812

(以上各欄由本局填註)

中文說明書修正頁(89年2月)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	純化肝素份，其製法及醫藥組合物
	英 文	"PURIFIED HEPARIN FRACTIONS, METHOD FOR OBTAINING THEM AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM"
二、發明人	姓 名	1. 布蘭尼雷克·珍—法蘭科斯 2. 艾斯皮荷·荷西 3. 皮卡特·菲利浦
	國 籍	均法國
	住、居所	1. 法國蒙聖安格南市巴克迪拉莎尼街7號 2. 法國波斯昆洛米市赫布西街707號 3. 法國洛恩市阿曼卡瑞街21號
三、申請人	姓 名 (名稱)	法商沙諾費—辛芷拉保公司
	國 籍	法國
	住、居所 (事務所)	法國巴黎市第174大道
	代 表 人 姓 名	高登·萊特

O:\36\36251.DOC\LUI

438812

(由本局填寫)

承辦人代碼:	—
大類:	
IPC分類:	

C6

D6

本案已向:

國(地區) 申請專利, 申請日期: 案號: , ☐有 ☐無主張優先權
法 1993.5.7 9305534

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

本發明係有關純化肝素份，且更特別是有關不含總亞硝基化合物之肝素份，及有關其製法及含其之醫藥產物。

更特別地，本發明係有關由亞硝酸解聚作用所得之肝素，其實際上缺乏亞硝基化合物。

肝素份已知可由亞硝酸解聚作用而得，例如述於專利申請案EP-A-0,014,184及EP-A-0,027,089者。由亞硝酸解聚作用所製備之某些肝素份係已在名為“低分子量肝素”或“小分子質量之肝素”下正常使用之醫藥產物之活性主成份。所有有關使用作為醫藥產物之低分子量肝素，其分析及其硫酸鹽化程度（以硫酸鹽／羧基比例表示），均可參考公開刊物“Heparines de faible masse moleculaire”〔小分子質量之肝素〕，Pharmeuropa，1991年8月，3, N. 3，第161-165頁，及參考歐洲藥典“Heparina massae molecularis minoris”1993年2月（PA/PH/Exp. 3T (92) 93）專題論文。因而製備目使用作為醫藥產物之活性主成份之某些低分子量肝素述於號數為

FR-A-2478646；EP-A-0,037,319；EP-A-0,076,279及EP-A-0,181,259之專利申請案或專利公報中。其在國際非專有名稱（INN）下，已知為nadroparin鈣，dalteparin鈉及reviparin鈉，且構成已上市或可能上市之產品之活性主成份。特別是reviparin鈉構成在德國上市之產品CLIVARIN[®]之活性主成份。其他由亞硝酸鹽解聚作用所得之低分子量肝素亦存在於德國（MONOEMBOLEX[®] NM），澳洲（SANDOPARIN[®]及TROPARIN[®]及瑞士（SANDOPARINE[®]）之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

26

五、發明說明(2)

醫藥商業處方下之某些產品中。

亞硝酸鹽解聚作用之方法係藉由添加-NO基至存在於肝素中或在其份數或片段中易進行亞硝基化之化合物上而形成非揮發性亞硝基化合物(後文中亦表示為N-NO化合物或相當簡單表示為N-NO)。雖然存在於肝素份中亞硝基化合物之量非常低且不利於其使用作為醫藥產品,且由於此化合物為非揮發性,因此此等產物以工業規模製造時需處理大量粉末。因而其似乎可用以使其完全移除或幾乎完全移除,以使使用作為醫藥產品之活性主成份之低分子量肝素之特性更完整。

在其平均分子質量小之低分子量肝素之情況中,例如,在下文中命名為CY 222(平均分子質量自1,700 Da至3,300 Da)之產品之情況中,亞硝基化合物之量可高於具有較高分子質量之產品之量。此產物適合在專利申請案及專利公告號數FR-2,478,646及EP-0,037,319中申請之產物之定義,且可依據述於相同專利申請案或專利中之方法製備。

因而基於上述理由,高度期望可提供由亞硝酸鹽解度所得且實際上不含亞硝基化合物之肝素份。

以低於200 nm波長,且較好為185 nm波長之紫外線照射及在鹼性pH下,於飲用水中同時消毒水而移除硝酸鹽之方法,述於P. PRINCZ等人論文,Water Supply, 1988, 6, 199-205中。然而,有關水處理之此文件無法預知紫外線照射是否可用於生物活性產物而不會對其生物及/或物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

46

五、發明說明(3)

理化學性質有不良影響。

目前已藉由使亞硝酸鹽解聚所得之肝素份進行紫外線作用(後文中表示為簡易UV)而發現,存在之亞硝基化合物幾乎可完全移除,而可得到含有亞硝基化合物總含量等於或甚至低於天然肝素之純化肝素份。

在所用條件下,亦已發現UV照射不會改良肝素份之結構,而可維持其所有生物及理化學性質。

因而,依據其目的之一,本發明係有關由亞硝酸鹽解聚而得且具有亞硝基化合物總含量不超過500份每兆(ppb)之肝素份,較有利者為不超過150 ppb,較好不超過100 ppb,又更好不超過50 ppb,在目前知識狀態下,50 ppb含量為可定量之最小量。該肝素份較好為低分子量肝素。

依據有利之目的,本發明係有關由亞硝酸鹽解聚所得之純化低分子量肝素,亦即由天然源,較好源自豬腸黏膜或牛肺之肝素或任何萃取自各種動物之組織或器官之其他肝素,以亞硝酸鹽解聚作用所得之解聚化肝素,其具有下列特徵:

- 低於8,000 Da之平均分子質量,
- 至少60%之所有構成份具有低於8,000 Da之分子質量,
- 不低於60 IU/mg之抗因子Xa活性,
- 抗因子Xa/抗因子IIa活性比例不低於1.5,
- 亞硝基化合物總含量不超過500 ppb,較有利為不超過150 ppb,較好不超過100 ppb,且更好不超過50 ppb;

該解聚化肝素係呈醫藥可接受鹽形態,較好為鈉或鈣鹽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

紅

五、發明說明(4)

抗因子 Xa 活性及抗因子 Xa/抗因子 IIa 活性比例係參考國際標準低分子量肝素而評估；參考物 WHO 1-85/600。

上述平均分子量質量之測定係依據歐洲藥典（參見上述參考文獻）之專題論文而測得。

本說明書中，“不含總亞硝基化合物”一詞係用以限定由亞硝酸鹽解聚所得之肝素份或低分子量肝素，且含有至多 500 ppb，更有利為至多 150 ppb，特別是至多 100 ppb 且較好至多 50 ppb 之總亞硝基化合物者。而“構成份”一詞係用以表示由低分子量肝素所構成之分子組。

本發明主題之不含總亞硝基化合物之低分子量肝素，在其主要構成份中，為在未還原端之 2-O-磺基- α -L-idopyranesuronic 結構及在還原端之 6-O-磺基-2,5-脫水-D-甘露糖醇結構，且磺化程度本質上與天然源之未分餾肝素無不同，此磺化程度係介於 2 及 2.5 之間，且較好介於 2.0 及 2.3 之間。

依據本發明有利之低分子量肝素具有可變分子質量分佈，其 90% 構成份之分子質量介於 2,000 Da 及 10,000 Da 之範圍，較好介於 2,000 Da 及 9,000 Da 之範圍，更好介於 2,000 Da 及 8,000 Da 之範圍；再者，這些肝素具有落於 3,000 Da 及 6,000 Da 間，且較好落於 4,000 Da 及 5,000 Da 間之壓倒性分子質量。

本發明之其他較佳低分子量肝素具有在 1,700 Da 及 3,300 Da 範圍間之壓倒性分子質量，且 90% 之所有構成份

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(5)

之分子質量介於1,000 Da及8,000 Da之間。

"壓倒性分子質量"一詞係表示相當於使用UV偵測器在 $\lambda = 205 \text{ nm}$ 時，以阻排層析儀(exclusion chromatography)所得之層析輪廓圖之峰之肝素構成份之分子質量。

純化CY 222，係定義為得自豬腸黏膜之天然來源之肝素以亞硝酸解聚所得之解聚化肝素之鈉鹽，其具有：

- 介於1,700 Da及3,300 Da範圍間之壓倒性分子質量，
- 90% 構成具有介於1,000 Da及8,000 Da範圍間之分子質量，
- 在其構成份主要部份之未還原端之2-O-磺基- α -L-艾杜吡喃sulfonic結構及在還原端之6-O-磺基-2,5-脫水-D-甘露糖醇結構，
- 約2.1之磺化程度，
- 60-80 IU/mg之抗因子Xa活性，
- 抗因子IIa活性不大於25 IU/mg，更好為10-15 IU/mg，
- 亞硝基化合物總含量不超過100 ppb（每毫克產物為 1×10^{-7} 毫克之亞硝基化合物），更好不超過50 ppb（每毫克產物為 5×10^{-8} 毫克亞硝基化合物），

該CY 222表示本發明之較佳肝素份。

本發明之不含總亞硝基化合物之肝素份（低分子量肝素）係依據本發明之另一目的製備者。

因而，本發明亦有關一種製備至多含有50 ppb總亞硝基化合物之肝素份之方法，其特徵為使由亞硝酸鹽解聚作用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(6)

所得之肝素份之水溶液進行紫外線照射。

至於起始物，可使用由亞硝酸鹽解聚作用所得之任何肝素份。此種起始物通常含有介於1,000及20,000 ppb間之亞硝基化合物總含量。

總亞硝基化合物之測定係以B. Pignatelli 等人述於Analyst, 1989年9月, 114, 第1103-1108頁及於Anglyst, 1987年7月, 112, 第945-949頁中，適用於肝素及其份數，較好適用於低分子量肝素之方法進行。

本發明方法可在溶於水中之醫藥級低分子量肝素上進行，或在工業製造上，在亞硝酸鹽解聚步驟之後及在純醫藥級產物單離之前進行。較好使用醫藥級低分子量肝素。

因而，作為本發明方法之起始物，可使用由亞硝酸鹽解聚作用所得之任何低分子量肝素。為了獲得最大效率之方法，可有利地使用不含懸浮微粒之解聚化肝素溶液。這些微粒之存在可能係由於解聚化肝素之不良溶解度或由於各種雜質，或由於使用於解聚作用或純化作用中之試劑殘留物。因此，解聚化肝素之各種溶液較好進行事先過濾。

本發明方法由於可簡單，快速且安全地移除亞硝基化合物，因此預期有效且易適用者。此外，本發明之方法不會引起肝素份之結構任何改變，因而可嚴格地維持相同之生物性質及物理化學特徵。

本發明方法之進行，可使由亞硝酸鹽解聚作用所得之肝素份之5-15% m/V 水溶液，較好為欲純化之低分子量肝素之5-15% m/V 水溶液，在180至350 nm之波長，且較好在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

始

五、發明說明(7)

254 nm之波長下之UV照射系統下，於5℃至50℃，較好在15℃至35℃，且更好在室溫下進行。

溶液之pH為略酸性或略鹼性，特別是介於3及8之間，較好介於5及8之間。

照射時間係視所用之照射系統，照射功率及存在於肝素份中而欲移除之總亞硝基化合物之量而定。雖然通常實際上完全純化係在9-15分鐘後，但為約2至30分鐘。

至於UV照射系統，可能為可使肝素份溶液循環在UV照射源附近之靜態系統或動態系統，以動態系統較佳。在後者情況中，UV照射源可與圓筒管（“密閉”型裝置）或與導管（“開放”型裝置）組合使用；至於“密閉”型裝置，可使用JR1-50（KATADYN）UV殺菌器或任何其他對等裝置。

第1圖顯示“密閉”型裝置之一段。此裝置係由在配置之石英護套(2)周圍之UV燈(1)所組成。此含低分子量肝素之溶液循環至受石英護套所保護之UV燈周圍（循環液體(3)之護套）。其係經由位於UV燈一端之入口(4)導入，而出口(5)係位於UV燈之另一端。

當使用動態系統時，肝素份溶液循環至UV照射源附近之流速需適當地調整，以獲得移除亞硝基化合物所需之照射時間。可包含之不同參數為循環液體氣流之參數，UV照射源之大小及／或功率，水溶液之肝素份濃度及含於該份中欲移除之亞硝基化合物之量。

因此獲得之不含總亞硝基化合物之肝素份，或較好為低分子量肝素，可使用習知方法回收。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

當使用醫藥級之低分子量肝素作為起始物時，其足以使產物溶於水中，而調整溶液之pH介於3及8之間，較好介於5及8之間，並使此溶液進行本發明之方法。

亦可能使用天然來源之未分餾肝素作為起始物，較好呈鹽態，特別是肝素鈉，較好為源自豬腸黏膜者。此情況中，本發明方法在亞硝酸鹽解聚後，於製備不含總亞硝基化合物之純化終產物中，僅構成一個步驟。自肝素起始之整個方法代表本發明之進一步目標。

因而，依據其另一目的，本發明係有關一種由亞硝酸鹽解聚作用，而製備具有不超過500 ppb，較好不超過150 ppb，且更好不超過100 ppb，又更好不超過50 ppb之總亞硝基化合物含量之低分子量肝素之方法，其特徵在於：

- (a) 以鹼金屬亞硝酸鹽，較好為亞硝酸鈉之溶液（其比例為每公斤導入之肝素為15至69克亞硝酸鹽），在鹽酸存在下，於pH 1至5，且較好於pH 1.5至4下，處理未分餾肝素鈉之5-15% m/V水溶液20至50分鐘，並使所得產物，較好在鹼性介質中，以每公斤肝素起始物為5-20克之硼氫化鈉進行還原反應，以鹽酸破壞過量之硼氫化鈉，反應介質適當地中和，且產物以乙醇沉澱出，之後，因而所得之低分子量肝素適當地進行一或多次之醇分餾，
- (b) 因而所得之溶液進行紫外線照射，
- (c) 適當地進行層析純化，且純化且不含總亞硝基化合物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(9)

之解聚化肝素鈉，以氯化鈉及乙醇沉澱而單離，及適當地，

(d) 使鈉鹽轉化成其他醫藥可接受鹽，較好為鈣鹽。

依據較佳目的，本發明係有關一種製備純化CY 222之方法，該純化CY 222係定義為由源自豬腸黏膜之天然源肝素以亞硝酸解聚作用而得之解聚化肝素之鈉鹽，且具有：

— 介於1,700 Da及3,300 Da間範圍之壓倒性分子質量，
— 90%之構成份具有介於1,000 Da及8,000 Da間範圍之分子質量，

— 在其主要構成份之未還原端具有2-O-磺基- α -L-艾杜吡喃sulfonic結構及在還原端具6-O-磺基-2,5-脫水-D-甘露糖醇結構，

— 約2.1之磺化程度，

— 60-80 IU/mg之抗因子Xa活性，

— 不大於25 IU/mg之抗因子IIa活性，

— 亞硝基化合物之含量不超過100 ppb，較好不超過50 ppb，

該方法之特徵為：

(a) 以鹽酸及相對於導入之肝素之3.5至4%重量之鹼金屬亞硝酸鹽處理天然來源之未分餾肝素鈉之水溶液，同時pH維持酸性，並追蹤亞硝酸鹽離子之存在，直至呈陰性反應，接著使混合物鹼化，產物以硼氫化鈉還原，並以乙醇沉澱於中性介質中單離出解聚化產物，接著

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

(b) 因而所得產物之水溶液在約 pH 7 下，通過在 254 nm 之紫外線照射系統，因而所得溶液隨後導入陰離子交換管柱之上端，之後管柱以水且在約 pH 7 下沖洗，終產物以氯化鈉及乙醇沉澱而回收。

步驟 (a) 中，使用上述比例之亞硝酸鈉作為鹼金屬亞硝酸鹽。

較好，在方法之步驟 (b) 中，紫外線照射系統係配置 16W 燈管，且在 254 nm 之紫外線照射曝露時間約 9-15 分鐘，以動態 UV 照射系統較佳，且特別是“密閉”型裝置。有利地，進行 UV 照射之溶液濃度為 8-12% m/V。

依據進一步目的，本發明係有關含有不含總亞硝基化合物之純化肝素，較好是含有上述不含總亞硝基化合物之純化低分子量肝素作為活性主成份之醫藥組合物。

至於本發明之組合物，肝素份可呈凍乾態，或可為於殺菌之生物可接受溶劑（如水）或於生理溶液中，而於小玻璃的安瓿，於預填入之針筒或於“筆”型自我注射裝置中之皮下注射用溶液。各單位之醫藥劑量組合物可含有 50 至 50,000 IU 抗因子 Xa。

本發明之肝素份亦可單獨或與其他活性主成份混合而經靜脈內注射投藥。此外，其可藉鼻內或肺內噴霧而投藥。

本發明之較佳醫藥組合物含有上述之不含總亞硝基化合物之 CY 222 作為活性主成份，於劑量單位中含有 10 mg 至 5,000 mg 之呈鈉鹽態之 CY 222。

如上所述，總亞硝基化合物之測定係由 B. Pignatelli

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

繪

五、發明說明(11)

等人於 Analyst, 1979年9月, 114, 第1103-1108頁及於 Anglyst, 1987年7月, 112, 第945-949頁中, 適於肝素及低分子量肝素之方法進行。

圖式簡要說明

圖1顯示"密閉"型裝置之一段。

圖2顯示分析肝素所使用之設備。

圖式主要元件符號說明

圖1:

- 1 UV燈
- 2 石英護套
- 3 循環液體
- 4 入口
- 5 出口

圖2:

- 1 圓底瓶
- 2 冷凝管
- 3 起泡器
- 4 起泡器
- 5 起泡器
- 6 對等物
- 7 積分器 / 記錄器
- 8 穿刺塞子
- 9 隔膜

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

紙

五、發明說明(119)

14

分析方法

欲分析之產物較好呈粉末狀，因此，在測定存在於溶液中總亞硝基化合物之情況中，需先進行該溶液之冷凍乾燥，且隨後分析此凍乾之樣品。

1-試劑

用於100毫克肝素份之試劑如下：

一以20% m/V 胺基磺酸處理之醋酸乙酯（200克胺基磺酸於1,000毫升醋酸乙酯中之溶液，攪拌3天並在使用前經濾紙過濾），

一含15% 氫溴酸之醋酸（具聚乙烯塞子之小安瓿，含5毫升之30% 氫溴酸，在氫氣中冷卻並貯存於暗處；使用時，加入5毫升純醋酸，且混合物於暗處於小容器中搖晃並貯存，每一系列分析使用1安瓿），

一以5% m/V胺基磺酸處理之95% 甲醯胺（1克胺基磺酸於含5%純水之20毫升甲醯胺之溶液）。

2-標準溶液及欲分析樣品之製備

一 N-亞硝基二-正丙胺 (NDPA) 之標準溶液

78.62克純乙醇經由隔膜注射入含1克N-亞硝基二-正丙胺之Sigma ISOPAC瓶中，濃度為10,000 ppm之NDPA（3379 ppm之N-NO）。接著溶液以純乙醇稀釋至1/100並以0.5毫升份數分配於小密封安瓿中，濃度為100 ppm之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

NDPA，安瓿於+4℃下於暗處貯存。

* 低標準溶液：使用時，於乙醇中稀釋成1/100，接著於經處理甲醯胺中稀釋至1/17，濃度為0.0588 ppm之NDPA或19.9 ppb之N-NO。

* 中範圍標準溶液：使用時，於乙醇中稀釋成1/61，接著於經處理甲醯胺中稀釋至1/11，濃度為0.149 ppm NDPA或50.4 ppb N-NO。

* 高標準溶液：使用時，於乙醇中稀釋成1/10，接著於經處理甲醯胺中稀釋至1/10，濃度為1 ppm之NDPA或338 ppb之N-NO。

一 欲分析之樣品

肝素份之樣品於60℃真空下使用五氧化磷乾燥12小時；100毫克肝素份溶於1毫升經處理甲醯胺中，且混合物於搖晃器上搖晃30分鐘。

3-所用設備

所用之設示於第2圖

裝配

設備係由載有冷卻至-15℃之雙表面冷凝管(2)之500毫升派瑞斯(pyrex)圓底瓶(1)所構成。冷凝管連接至各含30毫升30%氫氧化鈉之三個串聯起泡器(3)，這些起泡器連接至兩個串聯裝設之冷卻阱，一個以熔融乙醇在-120℃製備(4)及另一個以熔融異戊烯在-160℃製備(5)。這些阱最後連接至化學發光偵測器(TEA)610型(Thermedics偵測器公司)或對等物(6)上。偵測器連接至

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(13)

積分器／記錄器(7)。

瓶之一端配置有可使氬氣流經過而導入之套管之穿刺塞子(8)，另一端，則為可使欲連接之GC型隔膜(9)(其可使樣品經由其注射)所提供之螺旋接頭。氬氣流及由TEA真空泵所產生之真空使氣體朝TEA吸引。

4-操作方式

4.1 - 設定偵測器

依據製造廠商之指示設定TEA，以獲得最大感應度及再現性。

分析前1小時，在2巴(bar)之壓力下打開氧供應器且流速於TEA 610(Thermedics 偵測器公司)之流量計上調整至0.02。

4.2 - 氬氧化鈉阱之製備

各阱填入30毫升之30%氬氧化鈉。

4.3 - 冷卻阱之製備

-120℃阱：緩慢於含250毫升乙醇之Dewar中倒入液態氮同時以木製竹板攪拌，直至獲得糊狀物。

-160℃阱：於含250毫升異戊烷之Dewar中緩慢倒入液態氮，同時以木製竹板攪拌，直至獲得糊狀物。

兩個玻璃阱置於其各別Dewar中，並串聯成迴路。

4.4 - 瓶-冷凝管脫水裝配

在氬氣下而無連接至TEA下，使50毫升醋酸乙酯回流1小時。

4.5 - 反應及分析

五、發明說明(14)

30毫升經處理之醋酸乙酯導入配有隔膜之新乾淨且乾燥圓底燒瓶中，瓶在冷凝管下裝設（低溫保持器需於2小時前打開至 -15°C ），瓶加熱器置於規定位置且使瓶加熱（位置4）。連接氬氣套管，流速調整至0.1升/分鐘且檢查整個迴路是否滲漏。僅與TEA之連接打開以避免過度壓力。當醋酸乙酯回流時，非常溫和地施加真空，且同時旋緊至TEA之入口，整個迴流中普遍充滿真空，且當系統平衡時，達2-4 mm Hg。在積分器/記錄器之10%完全大小下之TEA上設定為0。

經由隔膜，依序注入0.5毫升純水，2毫升稀氫溴酸，接著再次注入2毫升稀氫溴酸。在各注射之間，檢查指示器在積分器/記錄器上是否回至基準線。當試劑注入瓶中時，使指示器回至基準線，接著注射50微升(μl)之標準液或樣品。注射之間，使指示器回至基準線。在分析中，5個樣品係穿插於2個標準品之間，且以完全操作時間不超過60分鐘之方式進行此步驟。

4.6 - 總亞硝基化合物量之評估

以下式計算以ppb表示之N-NO量：

$$\text{N-NO ppb量} = \frac{\text{樣品面積} \times C_s \times 0.05 \times 44 \times 1000}{\text{標準品面積} \times 0.05 \times 0.1 \times 130.2}$$

其中：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(15)

- Cs: 標準液之NDPA以ppm表示之濃度(0.0588或0.149或1 ppm)
- 0.05: 標準品(ml)之測試試樣(分子)
- 44: N-NO之分子質量
- 1,000: ppm轉化成ppb
- 0.05: 樣品(ml)之測試試樣(分母)
- 0.1: 樣品以克數表示之測試試樣
- 130.2: NDPA之分子質量。

下列實例係用以說明本發明。

實例1

具有少於100 ppb之總亞硝基化合物含量之純化 nadroparin鈣之製備

階段A: 解聚作用及乙醇分餾作用

於反應器中，源自豬腸黏膜之肝素鈉20公斤以純水溶解，因而得10.3% (m/V) 區域中之終濃度，溶液之pH以濃鹽酸調整至2.5。

572克亞硝酸鈉導入反應器中，同時pH以濃鹽酸維持在2.5。

使用澱粉/碘化鉀試紙追蹤解聚反應，當測試呈陰性表不反應完全，反應溶液之pH以濃氫氧化鈉調至10，接著添加200克硼氫化鈉。混合物攪拌15小時，接著pH以濃鹽酸調至4及3.5之間，以破壞過量之硼氫化物。pH接著藉添加濃氫氧化鈉而調至7，產物接著以每體積水溶液添加2體積之乙醇而沉澱，使沉澱物沉降接著移除醇性水溶液上

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(16)

澄液。沉積物溶於400升純水中，於此溶液中添加氯化鈉直至得到20,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 之導電度。接著以pH以濃鹽酸調至4之值，攪拌下添加1體積絕對乙醇至溶液中。使產物沉降約60小時接著移除醇性水溶液上澄液，因而得呈鈉鹽之nadroparin。

接著沉澱物溶於純水中，而得以開始導入之肝素鈉為準為約18% m/V 濃度之溶液，且pH以濃氫氧化鈉調至7。接著溶液於配有孔隙度0.2 μm 之過濾匣之系統上過濾，自含nadroparin鈉之過濾溶液中，取出樣品，其不經階段B之方法處理（以UV照射處理），此樣品表示為“對照組”。

階段B：以UV照射之處理

對於UV照射處理，係使用Katadyn型JR1-50管，有用體積為750毫升。使用波長為254 nm。流速事先以使用純水之動性(peristaltic)泵之方式適當地調整（4,800 毫升/小時），因而得到的9分鐘之曝露於UV下之總時間（僅一次量而非再循環）。接著導入欲處理之nadroparin鈉，且迴路以純水洗滌直至經處理之產物於槽（接於Katadyn JR1-50管之出口處）中完全回收。

階段C：以層析法純化並轉化成鈣鹽

於前述階段中所得之nadroparin溶液於陰離子交換管柱上純化（0.5 升/公斤之導入之肝素鈉）。收集之溶出液之導電性以氯化鈉調整至10,000-20,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，接著添加1.5 體積之乙醇。產物靜置沉降約41小時，接著移除上澄液。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (17)

沉澱物溶於純水（以導入之肝素鈉之量為準，濃度：
18% m/V），並加入氯化鈣六水合物（9.63克／之導入之肝
素鈉），接著藉添加1.5 體積乙醇而進行乙醇沉澱，重複
以氯化鈣六水合物之鹽化步驟及以乙醇沉澱之純水步驟。
所得沉澱物在不高於60℃之溫度乾燥。

因而獲得批式1。

階段A 中所得之“對照組”批式亦依據此階段C 之方法處
理，並單離nadroparin 鈣之“對照組”批式。

在批式1 及nadroparin鈣之“對照組”批式上，進行物理
化學分析，及測定其生物活性之分析。

各種結果示於表I 及II。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(18)

表 I

物化測試

追蹤之參數	批式1 (經UV處理)	對照組 (未經UV處理)
總亞硝基化合物	53 ppb	3,150 ppb
游離磷酸鹽	0.05 %	0.06 %
5%溶液之pH	6.0	6.0
游離NH ₂	< 30 ppm	< 30 ppm
HPLC-GPC (UV 205 nm)		
重量平均分子質量 (Mw)	5,017 Da	4,933 Da
數平均分子質量 (Mn)	4,043 Da	4,052 Da
峰分子量	4,181 Da	4,192 Da
分散性	1.24	1.21
% MW > 10,000 Da	2.4	2.1
% MW > 8,000 Da	7.2	6.9
% MW > 2,000 Da	3.0	2.9
% MW > 1,800 Da	2.4	2.3

表 II

生物測試

追蹤之參數	批式1 (UV處理)	對照組 (未經UV處理)
抗因子Xa活性	124 IU/mg	123 IU/mg
抗因子IIa活性	29.3 IU/mg	30.4 IU/mg

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(19)

表 I 及 II 所示之結果證明 UV 處理不會引起 nadropain 之任何降解；實際上批式 1 之各種物理化學及生物特徵，如產物之層析輪廓，不同雜質含量，抗因子 Xa 活性及抗因子 IIa 活性與未經 UV 照射處理之對照組相同，僅有一組例外；在未處理對照組中總亞硝基化合物含量約為經 UV 照射處理之批式 1 中總亞硝基化合物含量之 60 倍高。

再者，電子常磁共振分析之結果證實以 UV 照射處理不會引起游離基之釋出。

實例 2

具總亞硝基化合物含量小於 50 ppb 之 CY 222 鈉鹽之製備

階段 A：解聚作用

於反應器中，使源自豬腸黏膜之肝素鈉 250 克以純水溶解，而得終濃度為 10.3% (m/V)，pH 以濃鹽酸調整至 2.5，導入 9.49 克亞硝酸鈉於反應器中，同時 pH 維持在 2.5，使用澱粉／碘化鉀試紙追蹤解聚反應，當測試為陰性時表示反應完全，反應溶液之 pH 以濃氫氧化鈉調整至 10 及 10.5 之間，接著加入 2.5 克硼氫化鈉，混合物攪拌 15 小時，接著使用濃鹽酸調整 pH 至 3.5 與 4 之間，而破壞過量之硼氫化物。pH 以添加濃氫氧化鈉調至 7，接著產物以對每體積溶液添加 2 體積乙醇而沉澱，使沉澱物沉降並移除上澄液，因而獲得呈鈉鹽態之 CY 222。因而所得產物含有 3,000 至 10,000 ppb 間之總亞硝基化合物（得自 3 次製備）。

階段 B：以 UV 照射處理

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

66

五、發明說明 (20)

前述步驟之沉澱物溶於純水中，而得終溶液濃度約為所導入肝素鈉量為準之10% m/V，且pH以鹽酸或氫氧化鈉調至7。調整泵之輸出後，因而所得溶液通過在254 nm下之紫外線照射系統（Katadyn JR1-50系統，其設有16 W燈管）。曝露於UV照射之時間為9至15分鐘。

階段C：層析之純化及最終沉澱作用

以UV照射處理後所得溶液在含有每公斤導入肝素鈉為至少2升之陰離子交換樹脂之層析管柱上純化。所收集之溶出液之導電度使用氯化鈉調至30-35 mS/cm，且其pH使用鹽酸調至7，接著對每體積之水溶液添加2體積乙醇，使沉澱物沉降並移除上澄液；沉澱物溶於純水中，而得以開始時導入之肝素鈉量為準，濃度為20% m/V之終溶液，溶液之導電度以氯化鈉調至30-35 mS/cm，且pH使用濃鹽酸或濃氫氧化鈉調至7及7.5之間，接著溶液以2體積之絕對乙醇沉澱，使沉澱物沉降。收集沉澱物，以乙醇洗滌並在不超過60℃之溫度乾燥。因而得到純CY 222，其定義為由豬腸黏膜之肝素經亞硝酸解聚作用而得之解聚化肝素之鈉鹽，此產物具有：

- 一 在1,700 Da及3,300 Da間範圍之壓倒性分子質量，90%之構成份在1,000 Da及8,000 Da範圍間，
- 一 其構成份主要部份之未還原端有2-O-磺基- α -L-艾杜吡喃sulfonic結構，及在還原端有6-O-磺基-2,5-脫水-D-甘露糖醇結構，
- 一 約2.1之磺化度，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (21)

- 60-80 IU/mg 之抗因子 Xa 活性，
- 不大於 25 IU/mg 之抗因子 IIa 活性，特別是 10-15 IU/mg 之活性，
- 亞硝基化合物含量小於 50 ppb。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要 (發明之名稱：純化肝素份，其製法及醫藥組合物)

一種由亞硝酸解聚反應所得且含至多 150 ppb 之總亞硝基化合物之肝素份，其係使已由亞硝酸鹽解聚之肝素接受 UV 照射作用所製得者。

英文發明摘要 (發明之名稱："PURIFIED HEPARIN FRACTIONS, METHOD FOR OBTAINING THEM AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM")

Heparin fractions obtained by nitrous depolymerization, containing at most 150 ppb of total nitroso compounds, prepared by subjecting heparins which have been depolymerized with a nitrite to the action of UV radiation.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種由亞硝酸鹽解聚作用所得之低分子量肝素，其具有50ppb至500 ppb 範圍內之總亞硝基化合物含量。
2. 根據申請專利範圍第1項之低分子量肝素，其中該低分子量肝素為其特徵在於其係由源自豬腸黏膜或源自牛肺之天然源肝素或任何萃取自各種動物之組織或器官之肝素經亞硝酸鹽解聚作用所得之解聚化肝素，其具有下列特徵：
 - 介於1,700至8,000Da間之平均分子質量，
 - 至少60% 之所有構成份具有介於1,700至8,000 Da間之平均分子質量，
 - 不小於60 IU/mg之抗因子Xa活性。
 - 抗因子Xa/抗因子IIa 活性比例介於1.5 至5 之間，
 - 其構成主要部份之未還原端有2-O-磺基- α -L-艾杜吡喃糖醛酸結構及在還原端有6-O-磺基-2,5-脫水-D-甘露糖醇結構，其係呈醫藥可接受性鹽態。
3. 根據申請專利範圍第2項之低分子量肝素，其中該低分子量肝素係呈鈉鹽或鈣鹽態。
4. 一種由源自豬腸黏膜之天然源肝素經亞硝酸鹽解聚作用所得之解聚化肝素之鈉鹽，其具有：
 - 介於1,700 Da及3,300 Da間範圍之壓倒性分子質量，
 - 90% 之構成份具有介於1,000 Da及8,000 Da間範圍之分子質量，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

- 其構成主要部份之未還原端有2-0-磺基- α -L-艾杜吡喃糖醛酸結構及在還原端有6-0-磺基-2,5-脫水-D-甘露糖醇結構，
 - 介於2至2.5間之磺化度，
 - 60-80 IU/mg之抗因子Xa活性，
 - 介於10IU/mg與25 IU/mg間之抗因子IIa活性，
 - 亞硝基化合物含量不超過100 ppb。
5. 根據申請專利範圍第4項之解聚化肝素之鈉鹽，其特徵為總亞硝基化合物之含量不超過50 ppb。
 6. 一種製備根據申請專利範圍第1至3項中任一項之低分子量肝素之方法，其特徵為由亞硝酸鹽解聚作用所得之低分子量肝素水溶液係進行紫外線照射。
 7. 一種製備根據申請專利範圍第4及5項之解聚化肝素之鈉鹽之方法，其特徵為由亞硝酸鹽解聚作用所得之低分子量肝素水溶液係進行紫外線照射。
 8. 根據申請專利範圍第6或7項之方法，其特徵為濃度為5-15% m/V之由亞硝酸鹽解聚作用所得低分子量肝素水溶液，在5℃及50℃間之溫度，曝露於波長為180至350 nm之紫外線照射系統下，而溶液之pH介於3及8之間。
 9. 根據申請專利範圍第6或7項之方法，其特徵為曝露係在254 nm，15℃及25℃間之溫度及5至8間之pH值下發生。
 10. 一種製造根據申請專利範圍第1至3項中任一項之低分子量肝素之方法，其特徵為：

六、申請專利範圍

(a) 在鹽酸存在下，於 pH 1至5，較好為 1.5 至 4 之間，以每公斤之導入之肝素為 15至69克亞硝酸鹽之比例，以亞硝酸鈉溶液處理 5-15% m/V 之未分餾肝素鈉之水溶液 20至50分鐘，因而所得產物較好在鹼性介質中，以每公斤之開始時導入之肝素為 5-20克之硼氫化鈉進行還原，以鹽酸破壞過量之硼氫化鈉，適當地中和反應介質，且產物以乙醇沉澱，接著，適當地使所得低分子量肝素進行一或多次醇分餾；

(b) 因而所得溶液進行紫外線光照射，

(c) 適當地進行層析純化，並以氫化鈉及乙醇沉澱而單離出純化且不含總亞硝基化合物之解聚化肝素鈉，及適當地

(d) 使鈉鹽轉化成其他醫藥可接受鹽。

11. 根據申請專利範圍第10項之方法，其中鹽酸在 pH 1.5至4之間。

12. 一種製造根據申請專利範圍第4項之解聚化肝素之鈉鹽之方法，其特徵為：

(a) 在鹽酸存在下，於 pH 1至5，較好為 1.5 至 4 之間，以每公斤之導入之肝素為 15至69克亞硝酸鹽之比例，以亞硝酸鈉溶液處理 5-15% m/V 之未分餾肝素鈉之水溶液 20至50分鐘，因而所得產物較好在鹼性介質中，以每公斤之開始時導入之肝素為 5-20克之硼氫化鈉進行還原，以鹽酸破壞過量之硼氫化鈉，適當地中和反應介質，且產物以乙醇沉澱，接著，適當地使所得低分子量肝素進行一或多次醇分餾；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

訂

六、申請專利範圍

(b) 因而所得溶液進行紫外線光照射，

(c) 適當地進行層析純化，並以氫化鈉及乙醇沉澱而單離出純化且不含總亞硝基化合物之解聚化肝素鈉，及適當地

(d) 使鈉鹽轉化成其他醫藥可接受鹽。

13. 根據申請專利範圍第12項之方法，其中鹽酸在 pH 1.5至4 之間。

14. 一種製備根據申請專利範圍第4項之得自天然來源肝素經亞硝酸鹽解聚作用所得之解聚化肝素之鈉鹽之方法，其特徵為：

(a) 以鹽酸及相對於所導入肝素為 3.5 至 4% 重量之量之鹼金屬亞硝酸鹽處理未分餾之肝素鈉水溶液，同時 pH 維持酸性，追蹤亞硝酸鹽離子之存在直至呈陰性反應，接使鹼化混合物，產物以硼氫化鈉還原，並以乙醇沉澱而於中性介質中單離出解聚產物，接著，

(b) 因而所得產物之水溶液在約 pH 5至8之間下通過在 254 nm 之紫外光照射系統，隨後因而所得溶液導入陰離子交換管柱之上端，之後管柱以水沖洗且在 pH 5至8之間之下，以氫化鈉及乙醇沉澱而回收終產物。

15. 根據申請專利範圍第14項之方法，其特徵為在步驟(b)中，254 nm 之紫外光照射系統係以 16 W UV 燈照射 9 至 15分鐘，進行 UV 照射之產物溶液濃度為 8-12% m/v。

16. 一種醫藥組合物，其含有根據申請專利範圍第1至3項中任一項之低分子量肝素作為活性主成份。

17. 一種醫藥組合物，其含有根據申請專利範圍第5項之解

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

聚化肝素之鈉鹽作為活性主成份。

18. 一種醫藥組合物，其每劑量單位含有10毫克至5,000毫克之根據申請專利範圍第4項之鈉鹽作為活性主成份。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

紙

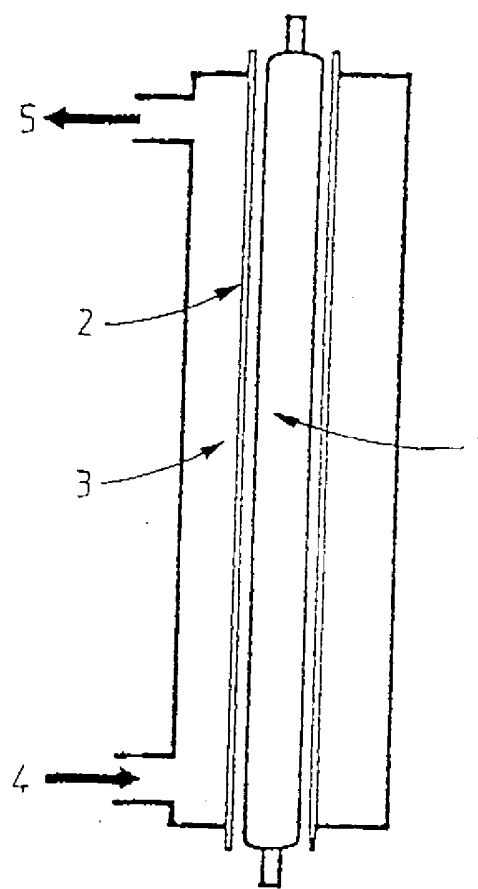
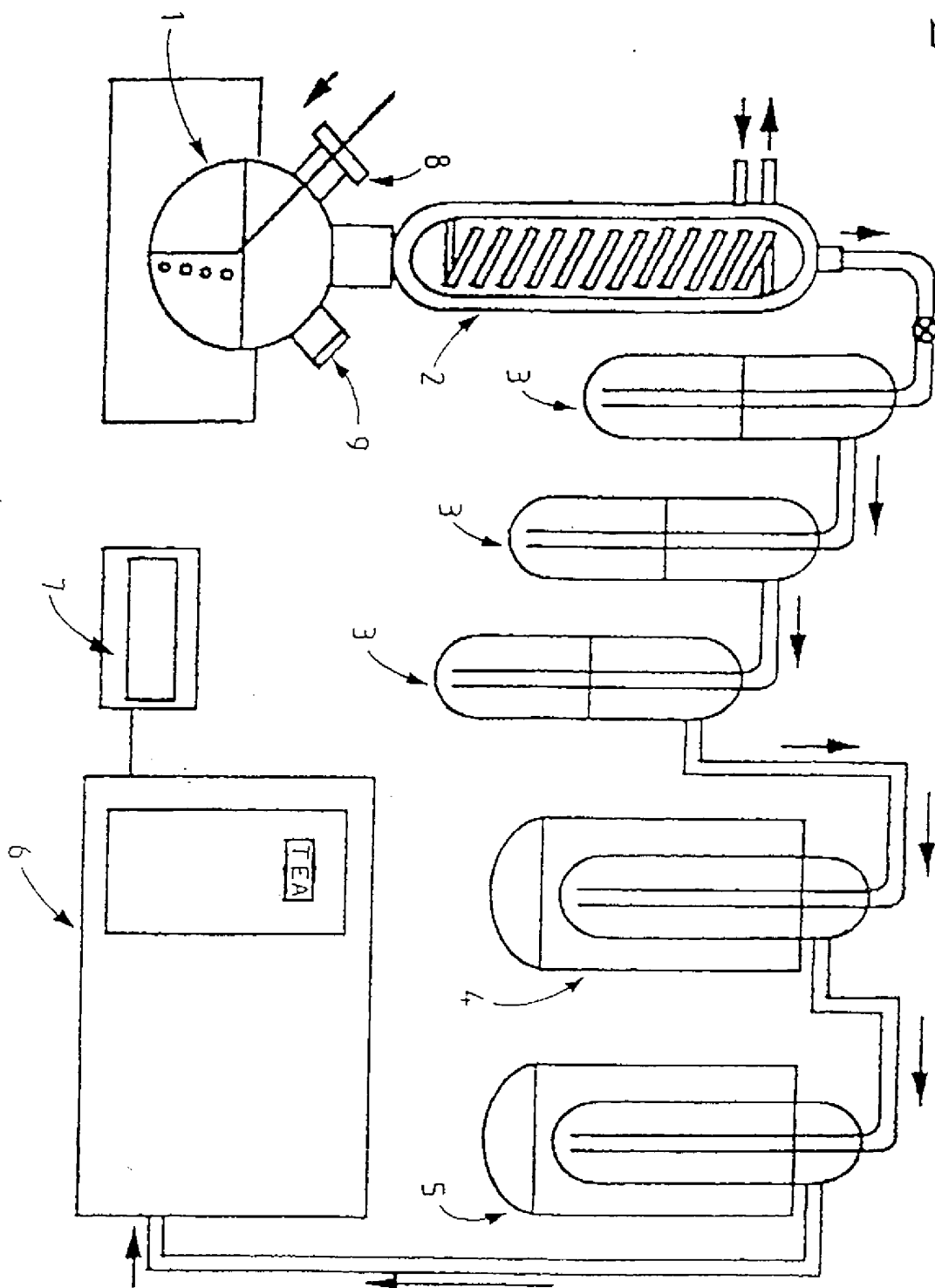


圖 1

圖 2



申請日期	83.05.07
案 號	83104157
類 別	C08B 37/10 A61K 31/15

A4
C4

433812

(以上各欄由本局填註)

中文說明書修正頁(89年2月)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	純化肝素份，其製法及醫藥組合物
	英 文	"PURIFIED HEPARIN FRACTIONS, METHOD FOR OBTAINING THEM AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM"
二、發明人	姓 名	1. 布蘭尼雷克·珍—法蘭科斯 2. 艾斯皮荷·荷西 3. 皮卡特·菲利浦
	國 籍	均法國
	住、居所	1. 法國蒙聖安格南市巴克迪拉莎尼街7號 2. 法國波斯昆洛米市赫布西街707號 3. 法國洛恩市阿曼卡瑞街21號
三、申請人	姓 名 (名稱)	法商沙諾費—辛芷拉保公司
	國 籍	法國
	住、居所 (事務所)	法國巴黎市第174大道
	代 表 人 姓 名	高登·萊特

O:\36\36251.DOC\LUI

五、發明說明(11)

等人於 Analyst, 1979年9月, 114, 第1103-1108頁及於 Anglyst, 1987年7月, 112, 第945-949頁中, 適於肝素及低分子量肝素之方法進行。

圖式簡要說明

圖1顯示"密閉"型裝置之一段。

圖2顯示分析肝素所使用之設備。

圖式主要元件符號說明

圖1:

- 1 UV燈
- 2 石英護套
- 3 循環液體
- 4 入口
- 5 出口

圖2:

- 1 圓底瓶
- 2 冷凝管
- 3 起泡器
- 4 起泡器
- 5 起泡器
- 6 對等物
- 7 積分器 / 記錄器
- 8 穿刺塞子
- 9 隔膜

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

紙

五、發明說明(119)

14

分析方法

欲分析之產物較好呈粉末狀，因此，在測定存在於溶液中總亞硝基化合物之情況中，需先進行該溶液之冷凍乾燥，且隨後分析此凍乾之樣品。

1-試劑

用於100毫克肝素份之試劑如下：

一以20% m/V 胺基磺酸處理之醋酸乙酯（200克胺基磺酸於1,000毫升醋酸乙酯中之溶液，攪拌3天並在使用前經濾紙過濾），

一含15% 氫溴酸之醋酸（具聚乙烯塞子之小安瓿，含5毫升之30% 氫溴酸，在氫氣中冷卻並貯存於暗處；使用時，加入5毫升純醋酸，且混合物於暗處於小容器中搖晃並貯存，每一系列分析使用1安瓿），

一以5% m/V胺基磺酸處理之95% 甲醯胺（1克胺基磺酸於含5%純水之20毫升甲醯胺之溶液）。

2-標準溶液及欲分析樣品之製備

一 N-亞硝基二-正丙胺 (NDPA) 之標準溶液

78.62克純乙醇經由隔膜注射入含1克N-亞硝基二-正丙胺之Sigma ISOPAC瓶中，濃度為10,000 ppm之NDPA（3379 ppm之N-NO）。接著溶液以純乙醇稀釋至1/100並以0.5毫升份數分配於小密封安瓿中，濃度為100 ppm之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(13)

積分器／記錄器(7)。

瓶之一端配置有可使氬氣流經過而導入之套管之穿刺塞子(8)，另一端，則為可使欲連接之GC型隔膜(9)(其可使樣品經由其注射)所提供之螺旋接頭。氬氣流及由TEA真空泵所產生之真空使氣體朝TEA吸引。

4-操作方式

4.1 - 設定偵測器

依據製造廠商之指示設定TEA，以獲得最大感應度及再現性。

分析前1小時，在2巴(bar)之壓力下打開氧供應器且流速於TEA 610(Thermedics 偵測器公司)之流量計上調整至0.02。

4.2 - 氬氧化鈉阱之製備

各阱填入30毫升之30%氬氧化鈉。

4.3 - 冷卻阱之製備

-120℃阱：緩慢於含250毫升乙醇之Dewar中倒入液態氮同時以木製竹板攪拌，直至獲得糊狀物。

-160℃阱：於含250毫升異戊烷之Dewar中緩慢倒入液態氮，同時以木製竹板攪拌，直至獲得糊狀物。

兩個玻璃阱置於其各別Dewar中，並串聯成迴路。

4.4 - 瓶-冷凝管脫水裝配

在氬氣下而無連接至TEA下，使50毫升醋酸乙酯回流1小時。

4.5 - 反應及分析

六、申請專利範圍

1. 一種由亞硝酸鹽解聚作用所得之低分子量肝素，其具有50ppb至500 ppb 範圍內之總亞硝基化合物含量。
2. 根據申請專利範圍第1項之低分子量肝素，其中該低分子量肝素為其特徵在於其係由源自豬腸黏膜或源自牛肺之天然源肝素或任何萃取自各種動物之組織或器官之肝素經亞硝酸鹽解聚作用所得之解聚化肝素，其具有下列特徵：
 - 介於1,700至8,000Da間之平均分子質量，
 - 至少60% 之所有構成份具有介於1,700至8,000 Da間之平均分子質量，
 - 不小於60 IU/mg之抗因子Xa活性。
 - 抗因子Xa/抗因子IIa 活性比例介於1.5 至5 之間，
 - 其構成主要部份之未還原端有2-O-磺基- α -L-艾杜吡喃糖醛酸結構及在還原端有6-O-磺基-2,5-脫水-D-甘露糖醇結構，其係呈醫藥可接受性鹽態。
3. 根據申請專利範圍第2項之低分子量肝素，其中該低分子量肝素係呈鈉鹽或鈣鹽態。
4. 一種由源自豬腸黏膜之天然源肝素經亞硝酸鹽解聚作用所得之解聚化肝素之鈉鹽，其具有：
 - 介於1,700 Da及3,300 Da間範圍之壓倒性分子質量，
 - 90% 之構成份具有介於1,000 Da及8,000 Da間範圍之分子質量，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂