

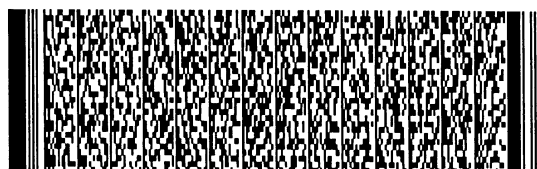
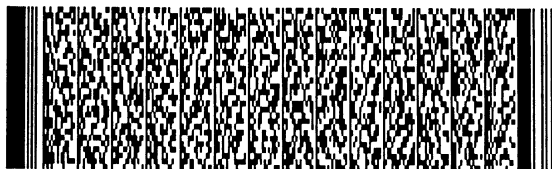
申請日期： 92. 10. 9	IPC分類
申請案號： 92/128028	C08B37/10, A61K31/727

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

200418882

一、 發明名稱	中 文	衍生自肝素之多糖混合物，其等製備方法及含其等之醫藥組成物
	英 文	MIXTURES OF POLYSACCHARIDES DERIVED FROM HEPARIN, THEIR PREPARATION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM
二、 發明人 (共4人)	姓 名 (中文)	1. 皮威斯 2. 葛魯克 3. 蒙皮爾
	姓 名 (英文)	1. BIBEROVIC, VESNA 2. GRONDARD, LUC 3. MOURIER, PIERRE
	國 籍 (中英文)	1. 2. 3.
	住居所 (中 文)	1. 法國安蘇包市沙吉塔街25號 2. 法國克爾尼市史魁爾街9號 3. 法國查爾斯登市伊尼沫街1號
	住居所 (英 文)	1. 25 allée du Sagittaire, 93600 AULNAY-SOUS-BOIS, France 2. 9 Square Babord, 91080 COURCOURONNES, France 3. 1 rue Etienne Mehul, 94220 CHARENTON LE PONT, France
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓 名 (中文)	1. 阿凡提斯藥品法國公司
	名稱或 姓 名 (英文)	1. AVENTIS PHARMA S. A.
	國 籍 (中英文)	1. 法國 FR
	住居所 (營業所) (中 文)	1. 法國安東尼市雷蒙德亞諾街20號 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英 文)	1. 20 avenue Raymond Aron, 92160 ANTONY, France
	代表人 (中文)	1. 馬迦烈
	代表人 (英文)	1. LE PENNEC, MAGALI



申請日期：	IPC分類
申請案號：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	
	英 文	
二、 發明人 (共4人)	姓 名 (中 文)	4. 魏克麗
	姓 名 (英 文)	4. VISKOV, CHRISTIAN
	國 籍 (中 英 文)	4.
	住 居 所 (中 文)	4. 法國理斯奧瑞市貝恩街3號
	住 居 所 (英 文)	4. 3 rue du Bearn, 91130 RIS ORANGIS, France
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓 名 (中 文)	
	名稱或 姓 名 (英 文)	
	國 籍 (中 英 文)	
	住 居 所 (營 業 所) (中 文)	
	住 居 所 (營 業 所) (英 文)	
	代 表 人 (中 文)	
	代 表 人 (英 文)	



一、本案已向

國家(地區)申請專利

申請日期

案號

主張專利法第二十四條第一項優先權

法國 FR

2002/10/10 0212584

有

二、☐主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間

日期：

四、☐有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☐有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☐熟習該項技術者易於獲得, 不須寄存。

五、發明說明 (1)

本發明係關於衍生自肝素之多醣類(polysaccharides)的混合物、其製備法與含其等之藥學組成物。

肝素是一種源自動物的硫酸酯化黏多醣類的混合物，被使用於，特別是其抗凝血劑與抗血栓的性質。

- 5 不過，肝素的缺點限制了其用途，明確地說，其高度抗凝血的活性(抗-IIa 活性)會造成出血不止。

已有人建議使用由肝素酯類的基本解聚反應製備得的低分子量之肝素(EP40144)，然而，這些產品仍具有高的抗-IIa 活性。

- 10 極低分子量之肝素也已被揭露於 US 6384021，然而，此揭露的實例中取得的抗-Xa 活性值不超過 120 IU，所得的抗-Xa/抗-IIa 比例為介於 15 與 50 間。

- 於 WO-0208295，是以不同於 US 6384021 揭露的方法製備極低分子量之肝素，且其呈現具抗-Xa/抗-IIa 比例為
15 介於 100 與 150 IU 之活性，對某些應用的實例，也相當的高。

然而，具改進抗-Xa 活性的這類醫藥品，特別是取得活性大於 150 IU/毫克，與抗-Xa/抗-IIa 比例，與因此發展新一代的肝素衍生物呈現不斷需求。

- 20 本發明的目的之一因此為藉由修飾之前技藝揭露的方法以改進抗-Xa 活性與抗-Xa/抗-IIa 比例，特別是藉由控制解聚反應步驟期間水的百分比達成，如此取得的肝素呈現極佳抗血栓性活性與具有類似於肝素之 aXa 活性，另一方面具有極低的 aIIa 活性而減少出血的危險性，類似地，

五、發明說明 (2)

本發明的產物呈現明顯要比肝素更大的半生期。

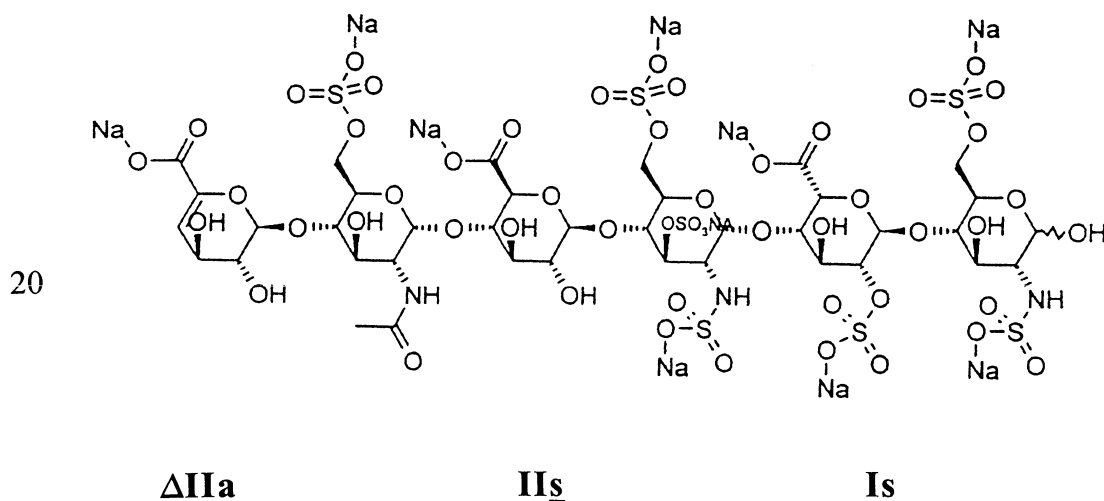
本發明的目的因此為衍生自肝素之新穎的多醣類之混合物，其對於經活化的因子 X(因子 Xa)與對於經活化的因子 II(因子 IIa)比肝素具有更多選擇的活性。

- 5 可了解的是，具有平均分子量為 1500 至 3000 Da 的多醣類的混合物可被稱之為寡醣類。

本發明的目的因此為具有肝素的構成之多醣類一般結構的硫酸酯化的寡醣類之混合物且具有下列特性者：

- 其具有平均分子量為 1500 至 3000 道爾頓(Daltons)，
 10 抗-Xa 活性為 120 至 200 IU/毫克，抗-IIa 活性為少於 10 IU/毫克與抗 Xa 活性/抗-IIa 活性比例為大於 30，
 -- 混合物之構成的寡醣類含有 2 至 26 個醣單元，具有 4,5-不飽和的糖醛酸 2-O-硫酸酯單元於其一末端，且含有如下化學式之六醣 Δ IIa-II_s-Is:

15



五、發明說明 (3)

本發明中所述的寡醣混合物中所含的六醣 Δ IIa-II_s-Is 是一種對 ATIII 具高度親和性之序列且特徵為對 aXa 之活性大於 740 U/毫克。

被揭露於本發明的寡醣類之混合物是呈鹼或鹼土金屬
5 鹽型式。

就鹼或鹼土金屬鹽型式而言，以鈉、鉀、鈣與鎂的鹽類為較佳。

平均分子量是利用高壓液相層析法，使用一系列兩管柱(例如以 TSK G3000 XL 與 TSK G2000 XL 之名販售者)
10 進行測定，偵測係使用折射計法進行，所用的流洗物為硝酸鋰，流速為 0.6 毫升/分鐘，此系統經標準品校正，標準品是利用於瓊脂醣-聚丙烯醯胺凝膠(IBF)上層析分劃 enoxaparin(一種源自豬之低分子量肝素，AVENTIS)而製備，此製備法係根據下面期刊所述技術進行：Barrowcliffe
15 et al., Thromb. Res., 12, 27-36 (1977-78)或 D.A. Lane et al., Thromb. Res., 12, 257-271 (1977-78)，利用 GPC6 軟體(Perkin Elmer)計算結果。

抗-Xa 活性是使用 Teien et al., Thromb. Res., 10, 399-410 (1977) 揭露的方法，與，作為標準品的第一種國際標準的低分子量肝素，利用醯胺分解的方法於呈色的受質上
20 進行，。

抗-IIa 活性是使用 Anderson L. O. et al., Thromb. Res., 15, 531-541 (1979) 揭露的技術，與，作為標準品的第一種國際標準的低分子量肝素進行。

五、發明說明（4）

六糖劃分宜佔有寡糖類混合物之 15 至 25%。

較適宜地，根據本發明的混合物含有自 8 至 15% 的六糖 Δ IIa-II $\underline{s}$ -Is 於寡糖類混合物中之六糖劃分中。

偵測六糖劃分的百分比可利用高壓液相層析法，於
5 TSK G3000 XL 與 TSK G2000 XL 之管柱上進行，或是自
六糖劃分經由製備性分離而得，此情況下，混合物是被置
於充填以聚丙烯醯胺瓊脂糖類型凝膠（例如，以商標
Ultrogel ACA202^R (Biosepra) 販售者）之柱層上層析，混合
物以碳酸氫鈉溶液流洗，較佳地，碳酸氫鈉溶液為 0.1 莫
10 耳/升至 1 莫耳/升的溶液，更佳地，此分離是在 1 莫耳/升
濃度下進行，使用 UV 光譜(254 nm)測定，在分割後，以
冰醋酸中和在碳酸氫鈉溶液中的六糖劃分，然後進行減壓
濃縮以製得醋酸鈉濃度高於 30% 重量計之溶液，經添加 3
至 5 倍體積之甲醇將此六糖劃分沈澱，於 3 號燒結玻璃上
15 過濾回收六糖劃分，所得的六糖混合物可使用 HPLC(高壓
液相層析)分析以測定六糖 Δ IIa-II $\underline{s}$ -Is 的含量，六糖 Δ IIa-
II $\underline{s}$ -Is 可以利用製備性 HPLC 層析單離或於抗凝血酶 III
sepharose 柱層進行親和性層析單離，係根據精於本技藝
者所知技術(M. Hook, I. Bjork, J. Hopwood and U. Lindahl,
20 *F.E.B.S Letters*, vol 656 (1) (1976))。

最特別地，根據本發明的混合物具有抗-Xa 活性為介
於 150 IU/毫克與 200 IU/毫克間。

較佳地，根據本發明的混合物具有抗-IIa 活性為少於 5
IU/毫克，且最佳地為少於 0.5 至 3.5 IU/毫克，揭露如下

五、發明說明 (5)

的應用實例證明，當使用此方法的較佳特性時具有介於 1.1 與 1.6 IU/毫克間之值。

較佳地，此混合物顯現抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例為大於 50 且特佳為大於 100。

- 5 較佳地，根據本發明的混合物具有平均分子量為介於 2000 與 3000 道爾頓間，且最佳為具有平均分子量為介於 2400 與 2650 Da 間。

本發明的主題因此為如上面定義的，具有抗-Xa 活性為介於 150 與 200 IU/毫克間、抗-IIa 活性為介於 0.5 與
10 3.5 IU/毫克間且平均分子量為介於 2400 與 2650 Da 間之混合物。

根據本發明的寡醣類混合物可以在有機介質中，將肝素的苯甲基酯的季銨鹽進行解聚反應而製備，係藉由 pKa 值宜大於 20 之強有機鹼(性質宜類似於所定義的磷并族
15 類，例如參考: R. Schwesinger et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987), R. Schwesinger et al., Angew. Chem. 105, 1420 (1993))，將解聚的肝素的苯甲基酯的季銨鹽轉變成鈉鹽，將殘留的酯類皂化，選擇地純化，根據本發明的方法，重覆如 WO 0208295 中揭露的方法之主要步
20 驟，一面添加入主要性狀，有可能製得根據本發明帶有物理化學的特性與所述活性之寡醣類的混合物。

確實地，為得到根據本發明的特別的寡醣類的混合物，有必要於解聚反應步驟期間精確控制混合物中的水含量。

五、發明說明(6)

根據本發明的方法在解聚反應期間藉由控制鹼的高選擇性實際地讓其具有特性，它使得可儘可能保存帶有對 ATIII 具親和力的序列(例如本發明中描述之六糖 Δ IIa-IIs-Is)的同時將肝素解聚，本發明的關鍵步驟使得可能製備出根

5 據本發明的多醣類。

本發明方法的特徵為依據寡醣類的混合物之平均分子量而言產生了未預期到的 aXa 活性(就介於 2000 Da 與 3000 Da 的平均分子量為 150 IU/毫克 < aXa < 200 IU/毫克)，此選擇性是由於極特別的具有 Pk 大於 20 之磷并鹼
10 類之物理化學特性而來，其具有高度的位阻現象(steric hindrance)與弱親核性之故。

當反應介質為無水物時，此效果可充分表現，換言之，當反應介質的水含量增加時，可觀察到解聚作用的選擇性急劇地減少，減少了對 ATIII 具親和性之序列的保存
15 是 aXa 活性大幅滑落的原因，在少量水存在下，磷并鹼被質子化且反應性型式變成季銨氫氧化物，此情況下，極高度的位阻現象與弱親核性之性質是消失了且大大影響所得產物的品質，當解聚試驗以估算的及控制的水含量進行時，此效果可看到被充分表現。

20 下表摘記水含量對解聚作用的選擇性的影響(試驗中僅有這些參數為變數：試劑間的化學計量，稀釋劑，根據精於本技藝者評定的固定溫度，所用的鹼為磷并鹼：2-第三-丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-二氮雜磷)。

五、發明說明（7）

水含量%	0.05%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.57%	1.8%	2.5%
aXa IU/毫克	1.92	177	161	132	122	120	105	99
aIIa IU/毫克	1.3	1.5	1.4	1.4	1.3	1.4	3.1	13.4
AXa / aIIa	148	118	115	94	94	85.7	34	7.4

為了序列對 ATIII 的親和性有最適的選擇性與最大的保存性，當係使用 1 莫耳當量的磷井(phosphazeze)鹼相對於
5 肝素的苯甲基酯，苯銨松寧(benzethonium)鹽時，此反應宜在水含量少於 0.6%且最好少於 0.3%下進行。

本發明的目的中最特別的步驟因此為：根據精於本技藝者所知方法製備得的肝素之苯甲基酯之季銨鹽的解聚反應，特點為，係使用磷井類一族的鹼，特別是置於含有少
10 於 0.6%的水之二氯甲烷溶液，較佳地，水分的百分比應選擇少於 0.3%，且特別是少於 0.2%。

較有利地，強鹼/酯的莫耳比例為介於 0.2 與 5 間，宜為介於 0.6 與 2，且最好為介於 0.8 與 1.2 間，故使用等莫耳比例下形成本發明的較佳具體實例的部分。

15 也可使用精於本技藝者所知的其他疏質子溶劑類，例如 THF 或 DMF。

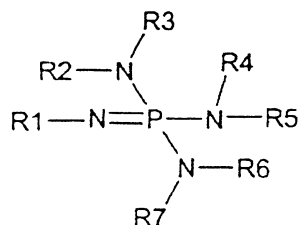
肝素的苯甲基酯的季銨鹽宜為苯銨松寧、鯨蠟基吡啶鎘或鯨蠟基三甲基銨鹽。

裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(8)

磷并類(phosphazenes)一族的鹼宜為具下之化學式者：



5

其中 R1 至 R7 的基為相同或相異基，且代表烷基。

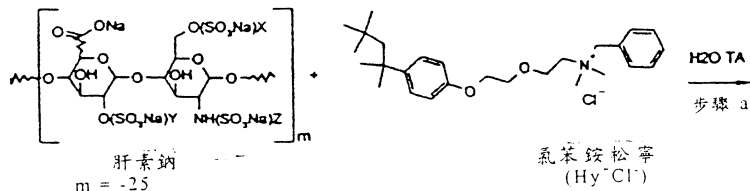
前面化學式中，在直鏈或支鏈型式之烷基含有 1 至 6 個碳原子。

本發明的主題因此為製備根據本發明的寡醣類的混合物之方法，係包括下列步驟：

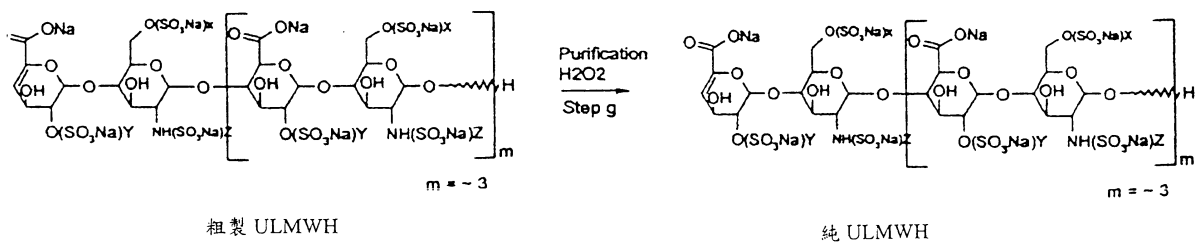
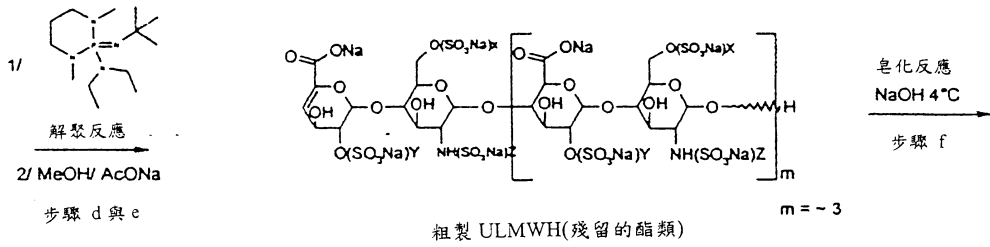
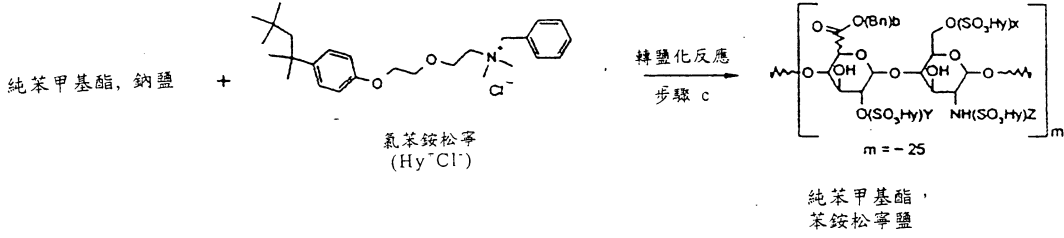
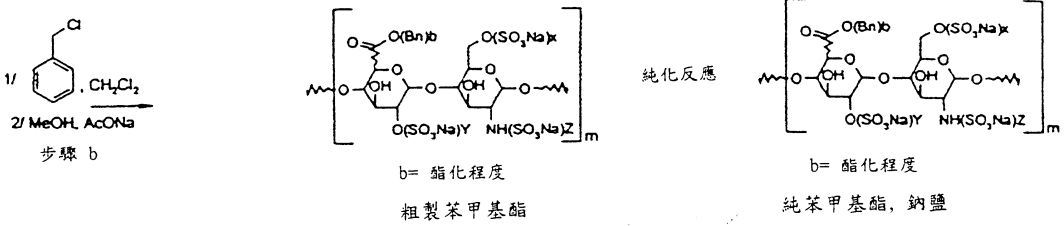
- a) 藉由與氯苯銨松寧(benzethonium chloride)的作用將肝素鈉進行轉鹽化反應(transalification)，
- b) 將與苯甲基氯作用產生的苯銨松寧肝素化物進行酯化反應，
- 15 c) 將製得的苯甲基酯進行轉鹽化反應成季銨鹽，
- d) 利用上述的方法，將肝素的苯甲基酯的季銨鹽進行解聚反應，
- e) 將季銨鹽轉變成鈉鹽，
- f) 利用鹼(例如氫氧化鈉)的作用進行肝素的選擇性皂化反應，
- 20 g) 進行選擇性純化反應，特別是利用氧化劑(例如過氧化氫)的作用。

下面反應圖表說明本發明：

五、發明說明 (9)



$n = X + Y + Z$ (二糖的磺酸的平均總值)
 $X =$ 此位置的磺酸化程度, 其餘基以 H 基代表
 $Y =$ 此位置的磺酸化程度, 其餘基以 H 基代表
 $Z =$ 此位置的磺酸化程度, 其餘基以 COCH_3 基代表



經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (10)

將解聚的肝素的苯甲基酯的季銨鹽轉變成鈉鹽(步驟 e) 通常是以醋酸鈉的酒精性溶液處理反應介質，且宜使用 10%在甲醇中之醋酸鈉(重量/容量)，在介於 15 與 25°C 間的溫度下進行，用於解聚反應中加入的醋酸鹽之重量當量 5 宜為 3 倍於肝素的苯甲基酯的季銨鹽的量。

皂化反應(步驟 f)通常是使用鹼金屬氫氧化物(例如氫氧化鈉，氫氧化鉀或氫氧化鋰)，於水溶液中，在介於 0 與 20°C，且宜於介於 0 與 10°C 間的溫度下進行，通常使用 1 至 5 莫耳當量的鹼金屬氫氧化物，較佳地，皂化反應是在 10 1 或 2 莫耳當量的鹼金屬氫氧化物存在下進行。

最後的產物可能藉由使用純化解聚的肝素類的任何方法(例如 EP 0037319B1)選擇地予以純化(步驟 g)，較佳地，此純化步驟是藉由過氧化氫，在水溶液介質中，於 10 至 50°C 的溫度下進行，較佳地，是在介於 20 與 40°C 的溫度 15 下作業。

肝素的苯甲基酯的季銨鹽可根據下述反應圖表製備：

- a) 利用氯苯銨松寧將肝素轉變成鈉鹽型式以製得苯銨松寧 20 肝素化物(轉鹽化反應)，
- b) 將上述製得的苯銨松寧鹽經由苯甲基氯予以酯化並以醋酸鈉的酒精性溶液處理以製得肝素的苯甲基酯之鈉鹽，
- c) 將肝素的苯甲基酯之鈉鹽轉鹽化成季銨鹽且宜為苯銨松寧鹽、鯨蠟基吡啶鎘鹽或鯨蠟基三甲基銨鹽。

步驟 a)是使用過量的氯苯銨松寧作用肝素鈉，在 15 至 25°C 的溫度範圍間進行，較佳地，鹽/肝素的莫耳比例

五、發明說明 (11)

為介於 3 與 4 間。

所用的起始之肝素宜為豬的肝素，後者可根據揭露於專利 FR2663639 中的方法，事先予以純化以減少其硫酸皮膚素(dermatan sulfate)值。

- 5 步驟 b)的酯化反應宜於氯化的有機溶劑(例如氯仿或二氯甲烷)中，在介於 25 至 45°C 且較佳地，在介於 30 與 40°C 的溫度間進行，然後將呈現苯銨松寧鹽型式的酯，使用 10%重量計的醋酸鈉之酒精(例如甲醇)溶液，經沈澱作用成鈉鹽型式被回收，通常對每體積之反應介質使用 1 至
- 10 1.2 體積的酒精，調整苯甲基氯的量與反應時間以取得酯化程度為介於 50 與 100%間，且較好為介於 70 與 90%間之產物，較佳地，係使用 0.5 至 1.5 份重的苯甲基氯對 1 份重的肝素之苯銨松寧鹽，同樣地，反應時間為介於 10 與 35 小時間。

- 15 轉鹽化步驟 c)是利用季銨鹽氯化物進行且宜使用氯苯銨松寧、鯨蠟基吡啶鎘氯或鯨蠟基三甲基銨氯，於水溶液介質中，在介於 10 與 25°C 間的溫度下進行，有利地，季銨氯化物/肝素的苯甲基酯的鈉鹽之莫耳比例為介於 2 與 3 間。

- 20 根據本發明的混合物，呈鈉鹽型式者，可被轉變成另種的鹼金屬或鹼土金屬鹽，從一種鹽轉成另種鹽可選擇地使用揭露於專利 FR 73 13 580 中方法達成。

根據本發明的混合物為無毒性且可被使用作為醫藥品之物。

五、發明說明 (12)

根據本發明的寡醣類之混合物可被使用作為抗血栓劑，明確地說，它們有用於供治療或預防靜脈的與動脈的血栓，深部靜脈血栓，肺栓塞，不穩定的心絞痛，心肌梗塞，心臟缺血，周圍動脈的阻塞性疾病與心房肌纖維顫動，它們也有用於預防與治療平滑肌細胞的增殖，動脈粥瘤硬化與動脈硬化，藉調節血管生成與生長因子而供治療與預防癌症，與供治療與預防糖尿病，例如糖尿病的視網膜病變與腎病變。

本發明也關於一種醫藥組成物，其係包含作為活性組成分之式(I)的混合物，選擇地組合一種或多種惰性賦型劑。

此醫藥組成物為，例如可供皮下或靜脈途徑注射之溶液，它們也有用於經由肺部投與(吸入方式)或經由口服投與。

所使用的劑量可根據患者的年齡、體重與健康狀態而定，就成人而言，通常每天經由肌肉內或皮下注射方式可投與介於 20 與 100 毫克間的量。

下面的實例是用來說明本發明而非指本發明僅限於此。

實例 A: 製備肝素苯甲基化物之苯銨松寧鹽

苯銨松寧肝素化物

將溶解於 125 毫升水之 25 克氯苯銨松寧之溶液加至溶解於 10 毫升水，呈鈉鹽型式之 10 克肝素之溶液，將產

五、發明說明 (13)

物過濾，經水洗滌並乾燥。

肝素的苯甲基酯(鈉鹽)

將 16 毫升的苯甲基氯加至溶解於 80 毫升二氯甲烷的
5 20 克苯銨松寧肝素化物之溶液，在 30°C 的溫度下將溶液
加熱 12 小時，然後加入 108 毫升溶解於甲醇的 10%醋酸
鈉溶液，將溶液過濾，經甲醇洗滌並乾燥，可製得呈鈉鹽
型式之 7.6 克的肝素之苯甲基酯，其酯化程度為 77%。

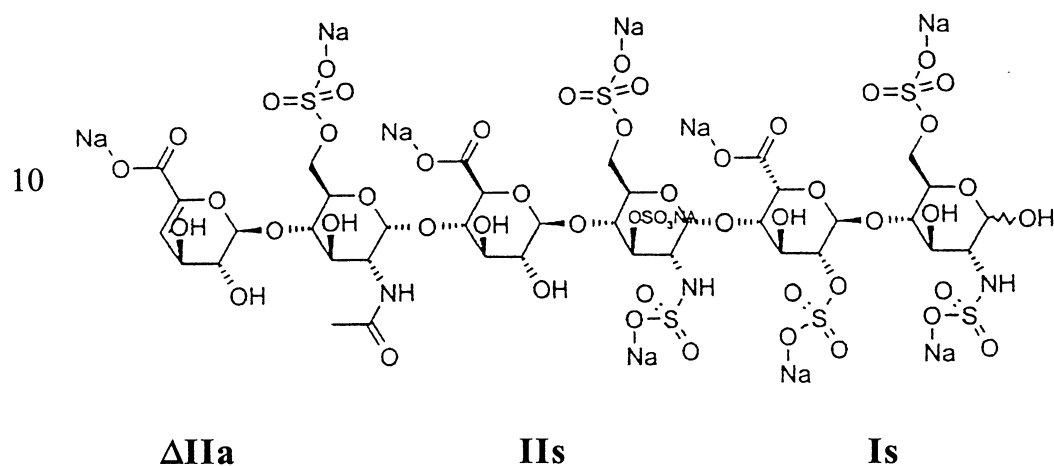
10 肝素的苯甲基酯 (苯銨松寧鹽)

將 36 克(0.0549 莫耳)的肝素的苯甲基酯(鈉鹽)與 540
毫升的蒸餾水一起置入 2 升的三角燒瓶 A 中，在約 20°C 下
均質化後，可得淺黃色的溶液，將 64.45 克(0.1438 莫耳)
的氯苯銨松寧與 450 毫升水置於 1 升三角燒瓶中 B 中，以
15 磁攪拌子攪拌成溶液，將三角燒瓶 B 中的溶液，在攪拌
下，以約 35 分鐘期間，倒至三角燒瓶 A 的溶液內，可看
到產生多量的沈澱，以 200 毫升的蒸餾水淋洗三角燒瓶 B
並將洗液倒入至三角燒瓶 A 中，停止攪拌，靜置懸浮液經
12 小時，待時間到達後，將上澄液移出丟棄，加入 560 毫
20 升水至沈降物(成漿狀物)並將混合物攪拌 20 分鐘，再靜置
約 30 分鐘使之沈澱，再除去上澄液(560 毫升)，重覆兩次
以 560 毫升蒸餾水洗滌沈澱物的操作，最後一次作業中，
沈澱物保留於懸浮液中，以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再
經各 200 毫升的蒸餾水洗滌四遍，濕的白色固體放乾水

五、發明說明 (14)

後，在 60°C 左右下進行減壓(2.7 kPa)乾燥，乾燥 12 小時後，可製得 87.5 克的苯甲基肝素化物，苯銨松寧鹽，收量為 94.9%。

5 實例 B：六糖 ATIII(Δ IIa-II_s-Is)的說明



- 15 D₂O 中之質譜, 500MHz, T=298 K, δ (ppm): 1.97 (3H, s), 3.18 (1H, dd, 10 與 3Hz), 3.30 (1H, t, 8Hz), 3.37 (1H, dd, 10 與 3Hz), 3.60 (2H, m), 介於 3.65 與 3.85 (6H, m), 3.87 (2H, m), 3.95 (1H, d, 8Hz), 4.03 (1H, d, 8Hz), 介於 4.05 與 4.13 (4H, m), 介於 4.16 與 4.45 (8H, m), 4.52
- 20 (1H, d, 8Hz), 4.67 (1H, m), 5.06 (1H, d, 6Hz), 5.10 (1H, d, 3Hz), 5.33 (1H, d, 4Hz), 5.36 (1H, d, 3Hz), 5.46 (1H, d, 3Hz), 5.72 (1H, d, 4Hz)。

4-去氧- α -L-蘇-次己基吡喃基糖醛酸-(1 $\rightarrow$ 4)-2-去氧-2-乙醯胺基-6-O-磺基- α -D-葡萄吡喃基-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄吡喃

五、發明說明 (15)

基糖醛酸-(1→4)-2-去氧-2-磺醯胺基-3,6-二-O-磺基- α -D-葡萄吡喃基-(1→4)-2-O-磺基- α -L-ido 吡喃基糖醛酸-(1→4)-2-去氧-2-磺醯胺基-6-O-磺基- α -D-葡萄吡喃糖之十二鈉鹽。

- 實例 1 至 7 與 12 說明水含量對聚合反應的選擇性與所得產物之 aXa 與 aIIa 活性之影響。
- 實例 8 至 10 說明鹼當量數對所得產物之 aXa 與 aIIa(水含量為 0.1%)的活性之影響。
- 實例 11 說明使用不是 2-第三-丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-二氮雜磷之磷并鹼，而是使用第三-丁基亞胺基三(吡咯啉基)磷烷。

實例 1

解聚反應與轉變成鈉鹽(0.1%水):

70 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌下慢慢加入由實例 A 方式製得的 10 克(0.006 莫耳)之肝素的苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，將反應介質的水含量調整至 0.1%，在氮氣層內將溶液加熱至 40°C，待全部溶解後，將溶液冷卻至 20°C 附近，接著添加 1.75 毫升(0.006 莫耳)的 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-二氮雜磷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 300 毫升的甲醇之 30 克無水醋酸鈉的溶液，待全部溶解後，加入 5 克的 Hyflo supercel Celite 至溶液內，以一分鐘三十秒的期間將三角燒瓶 A 中的反應混合物倒入溫度在 5°C 下，以磁攪拌

五、發明說明 (16)

子攪拌中之醋酸鈉酒精性溶液內，攪拌 5 分鐘後，令其沈降 1 個半鐘頭，其後將上澄液移出丟棄(220 毫升)，加入 220 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 1 小時 20 分鐘，再除去上澄液(250 毫升)，再加入 250 5 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 100 毫升的甲醇洗滌，濕的淡黃色固體濾乾後，在 40℃ 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 2.51 克在 Celite(5 克)中之解聚的肝素的鈉鹽，收量為 64%。

10

皂化反應：

上述方式製得的 2.5 克(0.0038 莫耳)在 Celite(5 克)中之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 17 毫升的水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 15 5 毫升的水洗滌二次，將所得濾液置於 150 毫升的三角燒瓶中，以磁攪拌子攪拌中，於 5℃ 下，加入 0.4 毫升(0.004 莫耳)的 30% 苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 3 克的氯化鈉，待溶解後，加入 21 毫升的甲醇至反應介質內，攪拌 15 分鐘後，加入 44 20 毫升的甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物在 5℃ 下沈降 45 分鐘，然後分離出上澄液，丟棄之(90 毫升)，加入 90 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 20 分鐘，再除去上澄液(80 毫升)，再加入 80 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，懸浮液

五、發明說明 (17)

中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 1.31 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 66%。

5

純化：

上述方式製得的 1.3 克粗製解聚的肝素與 13 毫升的蒸餾水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，在 40°C 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.7 ± 0.1 ，經由 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.07 毫升的 30% 過氧化氫水溶液，在 20°C 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸中和，接著添加 2 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾並倒入 14 毫升的甲醇，將溶液冷卻至 10°C，攪拌約 15 分鐘，加入 36 毫升甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沉降 15 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(50 毫升)，加入 50 毫升甲醇至沉降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 25 分鐘，再除去上澄液(50 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅再經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 1.13 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 87%。

15
20

所製得的解聚的肝素的特性如下：

平均分子量：2600 道爾頓

抗-Xa 活性：177 IU/毫克

五、發明說明 (18)

抗-IIa 活性：1.5 IU/毫克

抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：118

實例 2

5 解聚反應與轉變成鈉鹽(0.2% 水)：

70 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌並於氮氣壓下，慢慢加入由實例 A 方式製得的 10 克(0.006 莫耳)之肝素的苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，將反應介質的水含量調整至 0.2%，待全部溶解後，添加
10 1.75 毫升(0.006 莫耳)的 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-二氮雜磷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 300 毫升的甲醇之 30 克無水醋酸鈉的溶液，待全部溶解後，加入 5 克的 Hyflo supercel Celite 至溶液內，以一分鐘三十秒
15 的期間將三角燒瓶 A 中的反應混合物倒入溫度在 5°C 下，以磁攪拌子攪拌中之醋酸鈉酒精性溶液內，攪拌 5 分鐘後，令其沈降 2 小時，將澄清的上澄液丟棄(220 毫升)，加入 220 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 2 小時，再除去上澄液(230 毫升)，加入 230 毫升
20 甲醇至沈降物中，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 150 毫升的甲醇洗滌，濕的淡黃色固體濾乾後，在 40°C 下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 2.63 克在 Celite(5 克)中之解聚的肝素的鈉鹽，收量為 67%。

五、發明說明 (19)

皂化反應:

上述方式製得的 2.5 克(0.0038 莫耳)在 Celite(5 克)中之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 18 毫升的水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 5 毫升的水淋洗二次，將所得濾液置於 150 毫升的三角燒瓶中，以磁攪拌子攪拌中，於 5°C 下，加入 0.4 毫升(0.004 莫耳)的 30% 苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 2 克的氯化鈉，再倒入 14 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 36 毫升的甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物在 5°C 下沈降 45 分鐘，然後分離出上澄液，丟棄之(80 毫升)，加入 80 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 48 小時後，可製得 2.3 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 65%。

純化:

上述方式製得的 1.4 克粗製解聚的肝素與 15 毫升的蒸餾水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，在 40°C 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.7 ± 0.1 ，經由 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.07 毫升的 30% 過氧化氫水溶液，在 40°C 下攪拌約 2 小時後，將混合物冷卻至 20

五、發明說明 (20)

℃左右，然後添加 1N 鹽酸予以中和，接著添加 2 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾並倒入 14 毫升的甲醇，將溶液冷卻至 10℃，攪拌 15 分鐘，加入 36 毫升甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沈降 15 分鐘，
5 分離出上澄液，丟棄之(40 毫升)，加入 40 毫升甲醇至沈降物中(呈現漿液外觀)並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 20 分鐘，除去上澄液(50 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40℃左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 1.2 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 86%。

所製得的解聚的肝素的特性如下：

平均分子量：2650 道爾頓

抗-Xa 活性：161 IU/毫克

15 抗-IIa 活性：1.4 IU/毫克

抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：115

實例 3

解聚反應與轉變成鈉鹽(0.3% 水)：

20 70 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌並於氮氣壓下，慢慢加入由實例 A 方式製得的 10 克(0.006 莫耳)之肝素的苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，將反應介質的水含量調整至 0.3%，待全部溶解後，添加 1.75 毫升(0.006 莫耳)的 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-

五、發明說明 (21)

1,3-二甲基全氫-1,2,3-二氫雜磷，在 20℃下將所得混合物攪拌 24 小時，其間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 300 毫升的甲醇之 30 克無水醋酸鈉的溶液，待全部溶解後，加入 5 克的 Hyflo supercel Celite 至溶液內，以一分鐘三十秒的期間將三角燒瓶 A 中的反應混合物倒入溫度在 5℃下，以磁攪拌子攪拌中之醋酸鈉酒精性溶液內，攪拌 5 分鐘後，令其沈降 1 小時 10 分鐘，分出上澄清的上澄液丟棄 (220 毫升)，加入 220 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 100 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40℃左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 2.57 克在 Celite(5 克)中之解聚的肝素的鈉鹽，收量為 66%。

15 皂化反應：

上述方式製得的 2.5 克(0.0038 莫耳)在 Celite(5 克)中之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 18 毫升的水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 5 毫升的水淋洗二次，將所得濾液置於 150 毫升的三角燒瓶中，以磁攪拌子攪拌中，於 5℃下，加入 0.4 毫升(0.004 莫耳)的 30%苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 3 克的氯化鈉，再倒入 15 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 36 毫升的甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沈降 1 小

五、發明說明 (22)

時，然後分離出上澄液，丟棄之(70 毫升)，加入 70 毫升
甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，懸浮液中的沈澱
物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 50 毫升的甲醇洗
滌，濕的固體濾乾後，在 40℃ 左右下進行減壓(6 kPa)乾
5 燥，乾燥 48 小時後，可製得 1.42 克粗製解聚的肝素(鈉
鹽)，收量為 62%。

純化：

上述方式製得的 1.4 克粗製解聚的肝素與 15 毫升的
10 蒸餾水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，在 40℃ 下以攪拌子
攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.7 ± 0.1 ，經由 0.45 微
米薄膜將反應介質過濾並加入 0.07 毫升的 30%過氧化氫
水溶液，在 20℃ 下攪拌約 2 小時後，然後添加 1N 鹽酸予
以中和，接著添加 2 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜
15 過濾並倒入 14 毫升的甲醇，將濾液冷卻至 10℃，攪拌 15
分鐘，加入 36 毫升甲醇，再攪拌約 1 小時，其後停止攪
拌，令混合物沈降 40 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(50 毫
升)，加入 50 毫升甲醇至沈降物中(呈現漿液外觀)並將混
合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 25 分鐘，在懸浮液中的沈澱
20 物以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅經 50 毫升的甲
醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40℃ 左右下進行減壓(6 kPa)
乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 1.24 克純的解聚的肝素(鈉
鹽)，收量為 89%。

所製得的解聚的肝素的特性如下：

五、發明說明 (23)

平均分子量: 2400 道爾頓

抗-Xa 活性: 132 IU/毫克

抗-IIa 活性: 1.4 IU/毫克

抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例: 94

5

實例 4

解聚反應與轉變成鈉鹽(0.4% 水):

- 70 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌中慢慢加入由實例 A 方式製得的 10 克(0.006 莫耳)之肝素的苯
- 10 甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，將反應介質的水含量調整至 0.4%，於氮氣壓下，將溶液加熱至 30°C，待全部溶解後，冷卻至 20°C，接著添加 1.75 毫升(0.006 莫耳)的 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-二氮雜磷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其
- 15 間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 300 毫升的甲醇之 30 克無水醋酸鈉的溶液，待全部溶解後，加入 5 克的 Hyflo supercel Celite 至溶液內，以一分鐘三十秒的期間將三角燒瓶 A 中的反應混合物倒入溫度在 5°C 下，以磁攪拌子攪拌中之醋酸鈉酒精性溶液內，攪拌 5 分鐘後，令其沈降 2
- 20 小時，分出澄清的上澄液丟棄(80 毫升)，加入 80 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 1 小時，再除去上澄液(80 毫升)，加入 80 毫升甲醇至沈降物中攪拌 5 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 150 毫升的甲醇洗滌，濕的淡黃色固體濾乾後，

五、發明說明 (24)

在 40℃ 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 3.25 克在 Celite(5 克)中之解聚的肝素的鈉鹽，收量為 83%。

5 皂化反應：

上述方式製得的 3.1 克(0.0018 莫耳)在 Celite(5 克)中之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 21 毫升的水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 6 毫升的水淋洗二次，將所得濾液置於 150 毫升的三角燒瓶中，以磁攪拌子攪拌中，於 5℃ 下，加入 0.7 毫升(0.007 莫耳)的 30% 苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 4 克的氯化鈉，再倒入 28 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 72 毫升的甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沈降 1 小時，然後分離出上澄液，丟棄之(90 毫升)，加入 90 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，沈降約 20 分鐘，除去上澄液(90 毫升)，加入 90 毫升甲醇至沈澱物中並將混合物攪拌 5 分鐘，懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40℃ 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 48 小時後，可製得 1.9 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 67%。

純化：

上述方式製得的 1.9 克粗製解聚的肝素與 19 毫升的

五、發明說明 (25)

蒸餾水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，在 40°C 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.7 ± 0.1 ，經由 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.1 毫升的 30% 過氧化氫水溶液，在 20°C 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸予以中和，接著添加 2 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾並倒入 14 毫升的甲醇，將溶液攪拌 15 分鐘，加入 36 毫升甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沈降 15 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(40 毫升)，加入 40 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 20 分鐘，除去上澄液(50 毫升)，加入 500 毫升的甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再沈降約 20 分鐘，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 72 小時後，可製得 1.56 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 82%。

所製得的解聚的肝素的特性如下：

平均分子量：2350 道爾頓

抗-Xa 活性：122 IU/毫克

抗-IIa 活性：1.3 IU/毫克

20 抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：94

實例 5

解聚反應與轉變成鈉鹽(0.57% 水)：

140 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌中，

五、發明說明 (26)

慢慢加入由實例 A 方式製得的 20 克(0.019 莫耳)之肝素的
苯甲基酯(酯化程度為 75%, 苯銨松寧鹽), 將反應介質的
水含量調整至 0.57%, 待全部溶解後, 添加 3.5 毫升(0.012
5 莫耳)的 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-
1,2,3-二氮雜磷, 在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時, 其
間, 在三角燒瓶 B 中另配製溶在 600 毫升的甲醇之 60 克
無水醋酸鈉的溶液, 待全部溶解後, 加入 10 克的 Hyflo
supercel Celite 至溶液內, 以一分鐘三十秒的期間將三角
燒瓶 A 中的反應混合物倒入溫度在 4°C 下, 以磁攪拌子攪
10 拌中之醋酸鈉酒精性溶液內, 攪拌 5 分鐘後, 令其沈降
30 分鐘, 分出澄清的上澄液丟棄(400 毫升), 加入 400 毫
升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘, 再靜置約 1 小
時, 再除去上澄液(420 毫升), 加入 420 毫升甲醇至沈降
物中並予以攪拌 5 分鐘, 懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾,
15 濾餅再經 200 毫升的甲醇洗滌, 濕的淡黃色固體濾乾後,
在 50°C 下進行減壓(6 kPa)乾燥, 乾燥 18 小時後, 可製得
6.66 克在 Celite(10 克)中之粗製解聚的肝素, 收量為
85%。

20 皂化反應:

上述方式製得的 6.6 克(0.0101 莫耳)在 Celite(10 克)中
之粗製解聚的肝素的鈉鹽, 與 47 毫升的水被置於 50 毫升
的三角燒瓶中, 懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾, 再經 15
毫升的水淋洗二次, 將所得濾液置於 150 毫升的三角燒瓶

五、發明說明 (27)

中，以磁攪拌子攪拌中，於 5℃ 下，加入 1.1 毫升(0.011 莫耳)的 30%苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 9.5 克的氯化鈉，再倒入 66 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 171 毫升的甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物在 5℃ 下沈降 45 分鐘，然後分離出上澄液，丟棄之(160 毫升)，加入 160 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再沈澱約 20 分鐘，除去上澄液(180 毫升)，加入 180 毫升甲醇至沈降下來的沈澱中並將混合物攪拌 5 分鐘，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40℃ 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 4.53 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 74%。

15 純化：

上述方式製得的 4.53 克粗製解聚的肝素與 45 毫升的蒸餾水被置於 100 毫升的三角燒瓶中，在 40℃ 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.7 ± 0.1 ，經由 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.25 毫升的 30%過氧化氫水溶液，在 20℃ 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸予以中和，接著添加 5.5 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾並倒入 38 毫升的甲醇，將溶液冷卻至 10℃，攪拌 15 分鐘，加入 100 毫升甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沈降 20 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(90 毫

五、發明說明 (28)

升)，加入 90 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 25 分鐘，除去上澄液(100 毫升)，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 50°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 3.7 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 82%。

所製得的解聚的肝素的特性如下：

平均分子量：2200 道爾頓

抗-Xa 活性：120 IU/毫克

10 抗-IIa 活性：1.4 IU/毫克

抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：86

實例 6

解聚反應與轉變成鈉鹽(1.8% 水)：

15 140 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌中，慢慢加入由實例 A 方式製得的 20 克(0.019 莫耳)之肝素的苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，將反應介質的水含量調整至 1.8%，待全部溶解後，添加 3.5 毫升(0.012 莫耳)的 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-
20 1,2,3-二氮雜磷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 600 毫升的甲醇之 60 克無水醋酸鈉的溶液，待全部溶解後，加入 10 克的 Hyflo supercel Celite 至溶液內，以一分鐘三十秒的期間將三角燒瓶 A 中的反應混合物倒入溫度在 4°C 下，以磁攪拌子攪

五、發明說明 (29)

拌中之醋酸鈉酒精性溶液內，攪拌 5 分鐘後，令其沈降 30 分鐘，分出澄清的上澄液丟棄(400 毫升)，加入 400 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 1 小時，再除去上澄液(420 毫升)，加入 420 毫升甲醇至沈降物中攪拌 5 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 200 毫升的甲醇洗滌，濕的淡黃色固體濾乾後，在 50°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 7.54 克在 Celite(10 克)中之解聚的肝素的鈉鹽，收量為 96%。

10

皂化反應：

上述方式製得的 7.54 克(0.0101 莫耳)在 Celite(10 克)中之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 53 毫升的水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 15 毫升的水淋洗二次，將所得濾液置於 150 毫升的三角燒瓶中，以磁攪拌子攪拌中，於 4°C 下，加入 1.25 毫升(0.012 莫耳)的 30% 苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 10.5 克的氯化鈉，再倒入 70 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 190 毫升的甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物在 4°C 下沈降 45 分鐘，然後分離出上澄液，丟棄之(180 毫升)，加入 180 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再放置沈澱約 20 分鐘分出上澄液，移除(180 毫升)，加入 180 毫升甲醇至沈澱的沈澱物中並將混合物攪

20

五、發明說明 (30)

拌 5 分鐘，懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 50°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 5.53 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 80%。

5

純化：

上述方式製得的 5.53 克粗製解聚的肝素與 55 毫升的蒸餾水被置於 100 毫升的三角燒瓶中，在 40°C 下以攪拌子攪拌中，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.7 ± 0.1 ，經由
10 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.31 毫升的 30% 過氧化氫水溶液，在 20°C 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸予以中和，接著添加 7 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾並在 10°C 下，倒入 49 毫升的甲醇，再將溶液調至 20°C 並攪拌 15 分鐘，加入 126 毫升甲醇，再攪拌 1 小
15 時，其後停止攪拌，令混合物沈降 20 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(105 毫升)，加入 105 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 25 分鐘，除去上澄液(110 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾
20 後，在 55°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 4.53 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 82%。

所製得的解聚的肝素的特性如下：

平均分子量：2600 道爾頓

抗-Xa 活性：105 IU/毫克

五、發明說明 (31)

抗-IIa 活性：3.1 IU/毫克

抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：34

實例 7

5 解聚反應與轉變成鈉鹽(2.5% 水)：

140 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌中，慢慢加入由實例 A 方式製得的 20 克(0.019 莫耳)之肝素的苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，將反應介質的水含量調整至 2.5%，待全部溶解後，添加 3.5 毫升(0.012 莫耳)的 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-二氮雜磷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 600 毫升的甲醇之 60 克無水醋酸鈉的溶液，待全部溶解後，加入 10 克的 Hyflo supercel Celite 至溶液內，以一分鐘三十秒的期間將三角燒瓶 A 中的反應混合物倒入溫度在 4°C 下，以磁攪拌子攪拌中之醋酸鈉酒精性溶液內，攪拌 5 分鐘後，令其沈降 1 小時，分出澄清的上澄液丟棄(400 毫升)，加入 400 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 30 分鐘，再除去上澄液(400 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 200 毫升的甲醇洗滌，濕的淡黃色固體濾乾後，在 50°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 7.78 克在 Celite(10 克)中之解聚的肝素的鈉鹽，收量為 99.6%。

五、發明說明 (32)

皂化反應：

上述方式製得的 7.78 克(0.0119 莫耳)在 Celite(10 克)中之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 79 毫升的水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再
5 經 15 毫升的水淋洗二次，將所得濾液置於 150 毫升的三角燒瓶中，以磁攪拌子攪拌中，於 4°C 下，加入 1.3 毫升(0.012 莫耳)的 30%苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 10 克的氯化鈉，再倒入 60 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入
10 190 毫升的甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物在 4°C 下沈降 45 分鐘，然後分離出上澄液，丟棄之(180 毫升)，加入 180 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，使之沈降約 20 分鐘，分出上澄液(180 毫升)，加入 180 毫升的甲醇至沈澱物中並將混合物攪拌 5 分鐘，在懸
15 浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 50°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 5.87 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 82%。

20 純化：

上述方式製得的 5.87 克粗製解聚的肝素與 59 毫升的蒸餾水被置於 100 毫升的三角燒瓶中，在 40°C 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.7 ± 0.1 ，經由 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.34 毫升的 30%過氧化氫水

五、發明說明 (33)

溶液，在 20°C 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸予以中和，接著添加 7 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾並將溶液冷卻至 10°C 下倒入 49 毫升的甲醇，使溶液溫度變成 20°C 並予以攪拌 15 分鐘，加入 126 毫升甲醇，再攪拌 5 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沈降 20 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(105 毫升)，加入 105 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 25 分鐘，除去上澄液(110 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾 10 後，在 55°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 5.21 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 89%。

所製得的解聚的肝素的特性如下：

平均分子量：3550 道爾頓

抗-Xa 活性：99 IU/毫克

15 抗-IIa 活性：13.4 IU/毫克

抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：7.4

實例 8

解聚反應與轉變成鈉鹽(0.5 當量的鹼)：

20 140 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌中，慢慢加入由實例 A 方式製得的 20 克(0.019 莫耳)之肝素的苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，於 30°C 下待全部溶解後，將其冷卻至 20°C，添加 1.75 毫升(0.006 莫耳)的 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-

五、發明說明 (34)

二氮雜磷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 600 毫升的甲醇之 60 克無水醋酸鈉的溶液，將三角燒瓶 A 中的反應混合物在 4°C 的溫度下，以磁攪拌子攪拌中，倒入醋酸鈉之酒精性溶液內，

5 攪拌 1 小時後，讓其沈降 2 小時，分出澄清的上澄液丟棄 (420 毫升)，加入 420 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 30 分鐘，再靜置約 18 小時，再除去上澄液 (400 毫升)，加入 400 毫升的甲醇至沈澱物中並攪拌混合物 30 分鐘，分出上澄液 (400 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號

10 燒結的玻璃過濾，濾餅再經 100 毫升的甲醇洗滌二次，濕的淡黃色固體濾乾後，在 60°C 左右下進行減壓 (6 kPa) 乾燥，乾燥後，可製得 5.7 克粗製的解聚的肝素之鈉鹽，收量為 73%。

15 皂化反應：

上述方式製得的 5.7 克 (0.0086 莫耳) 之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 53 毫升的水被置於 100 毫升的三角燒瓶中，以磁攪拌子攪拌中，於 4°C 下，加入 0.93 毫升 (0.009 莫耳) 的 30% 苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 6 克的氯化鈉，再倒入 42 毫升

20 的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 108 毫升的甲醇，再攪拌 30 分鐘，其後停止攪拌，令混合物在 4°C 下沈降 30 分鐘，然後分離出上澄液，丟棄之 (180 毫升)，加入 180 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分

五、發明說明 (35)

鐘，使之再沈降約 30 分鐘，分出上澄液(170 毫升)，加入 170 毫升的甲醇至沈澱物中並將混合物攪拌 30 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 30 毫升的甲醇洗滌二遍，濕的固體濾乾後，在 60℃ 左右下
5 進行減壓乾燥，乾燥後，可製得 3.5 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 67.4%。

純化：

上述方式製得的 3.5 克粗製解聚的肝素與 35 毫升的蒸
10 餾水被置於 100 毫升的三角燒瓶中，在 40℃ 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.6 ± 0.1 ，經由 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.18 毫升的 30% 過氧化氫水溶液，在 20℃ 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸予以中和，接著添加 3.6 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾
15 並將溶液冷卻至 10℃ 下倒入 27 毫升的甲醇，使溶液溫度變成 20℃ 並予以攪拌 15 分鐘，加入 65 毫升甲醇，再攪拌 30 分鐘，其後停止攪拌，令混合物沈降 30 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(80 毫升)，加入 80 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 30 分鐘，再靜置約 30 分鐘，除去上澄
20 液(70 毫升)，加入 70 毫升甲醇至沈澱物中並攪拌 30 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅經 30 毫升的甲醇洗滌二遍，濕的固體濾乾後，在 60℃ 左右下進行減壓乾燥，乾燥後，可製得 2.8 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 80%。

五、發明說明 (36)

所製得的解聚的肝素的特性如下：

平均分子量：2900 道爾頓

抗-Xa 活性：146.1 IU/毫克

抗-IIa 活性：5.1 IU/毫克

5 抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：28.6

實例 9

解聚反應與轉變成鈉鹽(0.6 當量的鹼)：

280 毫升的二氯甲烷被置入三頸燒瓶 A 中，攪拌中，
10 慢慢加入由實例 A 方式製得的 40 克(0.024 莫耳)之肝素的
苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，於 30°C 下待全
部溶解後，將其冷卻至 20°C，添加 4.2 毫升(0.014 莫耳)的
2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-二
氮雜磷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其間，在
15 三角燒瓶 B 中另配製溶在 600 毫升的甲醇之 60 克無水醋
酸鈉的溶液，將三頸燒瓶 A 中的一半反應混合物，在 4°C
的溫度下，以磁攪拌子攪拌中，倒入醋酸鈉之酒精性溶液
內，攪拌 1 小時後，讓其沈降，分出澄清的上澄液丟棄
(310 毫升)，加入 310 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪
20 拌 1 小時，再靜置約 18 小時，再除去上澄液(400 毫升)，
加入 400 毫升的甲醇至沈澱物中並攪拌混合物 1 小時，分
出上澄液(300 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的
玻璃過濾，濾餅再經 100 毫升的甲醇洗滌二次，濕的淡黃
色固體濾乾後，在 60°C 左右下進行減壓乾燥，乾燥後，

五、發明說明 (37)

可製得 6 克粗製的解聚的肝素之鈉鹽，收量為 77%。

皂化反應：

上述方式製得的 6 克(0.0091 莫耳)之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 56 毫升的水被置於 250 毫升的三角燒瓶中，以磁攪拌子攪拌中，於 4℃ 下，加入 1 毫升(0.010 莫耳)的 30% 苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 6.4 克的氯化鈉，再倒入 45 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 115 毫升的甲醇，再攪拌 30 分鐘，其後停止攪拌，令混合物在 4℃ 下沈降 30 分鐘，然後分離出上澄液，丟棄之(170 毫升)，加入 170 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 30 分鐘，使之再沈降約 30 分鐘，分出上澄液(140 毫升)，加入 140 毫升的甲醇至沈澱物中並將混合物攪拌 30 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 30 毫升的甲醇洗滌二遍，濕的固體濾乾後，在 60℃ 左右下進行減壓乾燥，乾燥後，可製得 3.6 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 65.3%。

20 純化：

上述方式製得的 3.5 克粗製解聚的肝素與 35 毫升的蒸餾水被置於 100 毫升的三角燒瓶中，在 40℃ 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.6 ± 0.1 ，經由 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.18 毫升的 30% 過氧化氫

五、發明說明 (38)

水溶液，在 20°C 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸予以中和，接著添加 3.5 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾並將溶液冷卻至 10°C 下倒入 25 毫升的甲醇，使溶液溫度變成 20°C 並予以攪拌 15 分鐘，加入 63 毫升甲醇，再攪拌 30 分鐘，其後停止攪拌，令混合物沈降 30 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(70 毫升)，加入 70 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 30 分鐘，再靜置數分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅經 30 毫升的甲醇洗滌二遍，濕的固體濾乾後，在 60°C 左右下進行減壓乾燥，乾燥後，可製得 2.5 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 71.4%。

所製得的解聚的肝素的特性如下：

平均分子量：2600 道爾頓

抗-Xa 活性：150.5 IU/毫克

15 抗-IIa 活性：3.2 IU/毫克

抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：47

實例 10

解聚反應與轉變成鈉鹽(0.8 當量的鹼)：

20 70 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌中，慢慢加入由實例 A 方式製得的 10 克(0.006 莫耳)之肝素的苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，於 30°C 下待全部溶解後，將其冷卻至 20°C，添加 1.38 毫升(0.004 莫耳)的 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-

五、發明說明 (39)

二氮雜磷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 300 毫升的甲醇之 30 克無水醋酸鈉的溶液，將三角燒瓶 A 中的反應混合物，在 4°C 的溫度下，以磁攪拌子攪拌中，以 1 分 15 秒的時間倒入醋酸鈉之酒精性溶液內，攪拌 5 分鐘後，讓其沈降 1 小時，分出澄清的上澄液丟棄(190 毫升)，加入 190 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 30 分鐘，再除去上澄液(190 毫升)，加入 190 毫升的甲醇至沈澱物中並攪拌混合物 30 分鐘，分出上澄液(190 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 150 毫升的甲醇洗滌，濕的淡黃色固體濾乾後，在 40°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 3.05 克粗製的解聚的肝素之鈉鹽，收量為 80%。

15 皂化反應：

上述方式製得的 3.05 克(0.0048 莫耳)之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 21 毫升的水被置於 100 毫升的三角燒瓶中，溶液以 3 號燒結的玻璃過濾，再經 6 毫升的水淋洗二次，將所得濾液置於 150 毫升的三角燒瓶中，以磁攪拌子攪拌中，於 4°C 下，加入 0.6 毫升(0.006 莫耳)的 30% 苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 4 克的氯化鈉，再倒入 28 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 72 毫升的甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物在 4°C 下沈降 30 分鐘，

五、發明說明 (40)

然後分離出上澄液，丟棄之(80 毫升)，加入 80 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，使之再沈降約 30 分鐘，分出上澄液(80 毫升)，加入 80 毫升的甲醇至沈澱物中並將混合物攪拌 30 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號
5 燒結的玻璃過濾，濾餅再經 50 毫升的甲醇洗滌二遍，濕的固體濾乾後，在 40°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥後，可製得 1.6 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 57%。

純化：

- 10 上述方式製得的 1.6 克粗製解聚的肝素與 16 毫升的蒸餾水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，在 40°C 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.6 ± 0.1 ，經由 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.08 毫升的 30%過氧化氫水溶液，在 20°C 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸予以中
15 和，接著添加 2 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾並將溶液冷卻至 10°C 下倒入 14 毫升的甲醇，使溶液溫度變成 20°C 並予以攪拌 15 分鐘，加入 36 毫升甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沈降 30 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(50 毫升)，加入 50 毫升甲醇至沈降物
20 中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 30 分鐘，分出上澄液(50 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濕的固體濾乾後，在 40°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥後，可製得 1.25 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 78%。

五、發明說明 (41)

所製得的解聚的肝素的特性如下：

平均分子量：2400 道爾頓

抗-Xa 活性：154.3 IU/毫克

抗-IIa 活性：1.6 IU/毫克

5 抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：96.4

實例 11

解聚反應與轉變成鈉鹽：

- 140 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶 A 中，攪拌中，
- 10 慢慢加入由實例 A 方式製得的 20 克(0.019 莫耳)之肝素的
苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，將反應介質的
水含量調整至 2.5%，在 40°C 下全部溶解後，冷卻至 20°C
附近，添加 3.5 毫升(0.011 莫耳)的第三-丁基亞胺基三(吡
咯啶基)磷烷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其
15 間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 600 毫升的甲醇之 60 克
無水醋酸鈉的溶液，待全部溶解後，加入 10 克的 Hyflo
supercel Celite 至溶液內，以一分鐘三十秒的期間將三角
燒瓶 A 中的反應混合物倒入溫度在 4°C 下，以磁攪拌子攪
拌中之醋酸鈉酒精性溶液內，攪拌 5 分鐘後，令其沈降
20 30 分鐘，分出澄清的上澄液丟棄(400 毫升)，加入 400 毫
升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 1 小
時 20 分鐘，再除去上澄液(250 毫升)，加入 250 毫升的甲
醇至沈澱物內並將混合物攪拌 5 分鐘，在懸浮液中的沈澱
物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 200 毫升的甲醇洗

五、發明說明 (42)

滌，濕的淡黃色固體濾乾後，在 40℃ 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 5.39 克之解聚的肝素的鈉鹽，收量為 69%。

5 皂化反應：

上述方式製得的 5 克(0.0076 莫耳)之粗製解聚的肝素的鈉鹽，與 35 毫升的水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 10 毫升的水淋洗二次，將所得濾液置於 250 毫升的三角燒瓶中，於 4℃
10 下，以磁攪拌子攪拌中，加入 1 毫升(0.01 莫耳)的 30%苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 2 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 6 克的氯化鈉，再倒入 42 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 104 毫升的甲醇，再攪拌 15 分鐘，其後停止攪拌，令混合物在 4℃ 下沈降 1 小時，
15 然後分離出上澄液，丟棄之(140 毫升)，加入 140 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，使之再沈降約 45 分鐘，分出上澄液(160 毫升)，加入 160 毫升的甲醇至沈澱物中並將混合物攪拌 5 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 100 毫升的甲醇洗滌，濕的
20 固體濾乾後，在 40℃ 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 48 小時後，可製得 2.7 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 59%。

五、發明說明 (43)

純化：

上述方式製得的 2.6 克粗製解聚的肝素與 25 毫升的蒸餾水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，在 40℃ 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.7 ± 0.1 ，經由 0.45 微米
5 薄膜將反應介質過濾並加入 0.15 毫升的 30% 過氧化氫水溶液，在 20℃ 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸予以中和，接著添加 3 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄膜過濾並將溶液冷卻至 10℃ 下倒入 21 毫升的甲醇，使溶液溫度變成 20℃ 並予以攪拌 15 分鐘，加入 54 毫升甲醇，再攪
10 拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沈降 20 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(50 毫升)，加入 50 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 20 分鐘，除去上澄液(50 毫升)，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾
15 後，在 40℃ 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 2.35 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 90%。

所製得的解聚的肝素的特性如下：

- 平均分子量：2400 道爾頓
抗-Xa 活性：167.5 IU/毫克
20 抗-IIa 活性：1.1 IU/毫克
抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：152

實例 12

解聚反應與轉變成鈉鹽(0.05% 水)：

五、發明說明 (44)

140 毫升的二氯甲烷被置入三角燒瓶中，攪拌中，慢慢加入由實例 A 方式製得的 20 克(0.019 莫耳)之肝素的苯甲基酯(酯化程度為 75%，苯銨松寧鹽)，加入 20 克的 4A 分子篩至反應介質中並將其水含量調整至 0.05%，慢慢攪拌 48 小時，在惰性氣體氛圍下將上澄液移至三角燒瓶 A 中，待全部溶解後，添加 3.5 毫升(0.012 莫耳)的 2-第三-丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,2,3-二氮雜磷，在 20°C 下將所得混合物攪拌 24 小時，其間，在三角燒瓶 B 中另配製溶在 600 毫升的甲醇之 60 克無水醋酸鈉的溶液，待全部溶解後，加入 10 克的 Hyflo supercel Celite 至溶液內，再於 4°C 下，以磁攪拌子攪拌中，以約 2 分鐘的期間將三角燒瓶 A 中的反應混合物倒入此醋酸鈉之酒精性溶液內，攪拌 15 分鐘後，令其沈降 1 小時，分出澄清的上澄液丟棄(420 毫升)，加入 420 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 15 分鐘，再靜置約 1 小時，再除去上澄液(450 毫升)，加入 450 毫升的甲醇至沈澱物內並將混合物攪拌 15 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 200 毫升的甲醇洗滌，濕的淡黃色固體濾乾後，在 50°C 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 16 小時後，可製得在 Celite(10 克)中之 5.39 克之解聚的肝素的鈉鹽，收量為 68.6%。

皂化反應：

上述方式製得的在 Celite(10 克)中之 5.36 克(0.00817

五、發明說明 (45)

莫耳)之粗製解聚的肝素，與 50 毫升的水被置於 50 毫升的三角燒瓶中，懸浮液以 3 號燒結的玻璃過濾，再經 15 毫升的水淋洗四遍，將所得濾液置於 150 毫升的三角燒瓶中，於 4°C 下，以磁攪拌子攪拌中，加入 1.01 毫升(0.0122 5 莫耳)的 35%苛性鈉，加完後，將混合物攪拌 3 小時，添加 1N 鹽酸中和後，加入 11 克的氯化鈉，再倒入 77 毫升的甲醇至反應混合物內，攪拌 15 分鐘後，加入 200 毫升的甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物在 4°C 下沈降 1 小時，然後分離出上澄液，丟棄之(240 毫升)，
10 加入 240 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 10 分鐘，使之再沈降約 30 分鐘，分出上澄液(225 毫升)，加入 225 毫升的甲醇至沈澱物中並將混合物攪拌 10 分鐘，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，濾餅再經 50 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 40°C 左右下進行減壓(6
15 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 2.65 克粗製解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 53.7%。

純化：

上述方式製得的 2.65 克粗製解聚的肝素與 26.5 毫升
20 的蒸餾水被置於 100 毫升的三角燒瓶中，在 40°C 下以攪拌子攪拌，添加 1N 氫氧化鈉使其 pH 達 9.7 ± 0.1 ，經由 0.45 微米薄膜將反應介質過濾並加入 0.25 毫升的 30%過氧化氫水溶液，在 20°C 下攪拌約 2 小時後，添加 1N 鹽酸予以中和，接著添加 3 克的氯化鈉，再經由 0.45 微米薄

五、發明說明 (46)

膜過濾並將溶液冷卻至 10℃ 下，倒入 21 毫升的甲醇，使溶液溫度變成 20℃ 並予以攪拌 15 分鐘，加入 54 毫升甲醇，再攪拌 1 小時，其後停止攪拌，令混合物沈降 45 分鐘，分離出上澄液，丟棄之(46 毫升)，加入 46 毫升甲醇至沈降物中並將混合物攪拌 5 分鐘，再靜置約 30 分鐘，除去上澄液(50 毫升)，加入 50 毫升的甲醇，在懸浮液中的沈澱物以 3 號燒結的玻璃過濾，所得白色濾餅以 2 份的 10 毫升的甲醇洗滌，濕的固體濾乾後，在 50℃ 左右下進行減壓(6 kPa)乾燥，乾燥 18 小時後，可製得 2.363 克純的解聚的肝素(鈉鹽)，收量為 89.1%。

所製得的解聚的肝素的特性如下：

- 平均分子量：2500 道爾頓
- 抗-Xa 活性：192 IU/毫克
- 抗-IIa 活性：1.3 IU/毫克
- 15 抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：148

裝

計

線

四、中文發明摘要（發明之名稱：

衍生自肝素之多糖混合物，其等製備方法及
含其等之醫藥組成物

本發明係關於衍生自肝素之多醣類(polysaccharides)
的混合物，其具有平均分子量為 1500 至 3000 道爾頓
(Daltons)且抗-Xa/抗-IIa 之比例大於 30，其製備法與含其等
之藥學組成物。

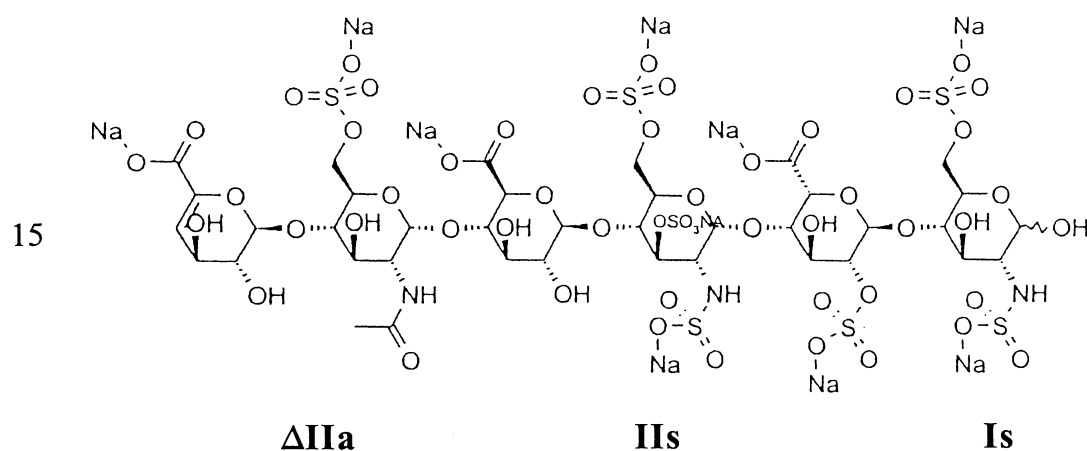
英文發明摘要（發明之名稱： MIXTURES OF POLYSACCHARIDES DERIVED FROM
HEPARIN, THEIR PREPARATION AND
PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING
THEM

The present invention relates to mixtures of
polysaccharides derived from heparin having a mean
molecular weight of 1500 to 3000 Daltons and an anti-
Xa/anti-IIa ratio greater than 30, their method of
preparation and pharmaceutical compositions containing
them.

六、申請專利範圍

1. 一種具有肝素的構成之多醣類一般結構且具有下列特性的硫酸酯化的寡醣類之混合物：

- 其具有平均分子量為 1500 至 3000 道爾頓(Daltons)，
抗-Xa 活性為 120 至 200 IU/毫克，抗-IIa 活性為少
於 10 IU/毫克與抗 Xa 活性/抗-IIa 活性比例為大於
30，
- 混合物之構成的寡醣類
 - 含有 2 至 26 個醣單元，
 - 具有 4,5-不飽和的糖醛酸 2-O-硫酸酯單元於
其一末端，
 - 含有具下面化學式之六醣 Δ IIa-II_s-Is：



且為呈現成鹼或鹼土金屬鹽型式。

2. 根據申請專利範圍第 1 項的寡醣類的混合物，特徵為，
其中鹼或鹼土金屬鹽係選自鈉、鉀、鈣與鎂之鹽類。
3. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項的寡醣類的混合物，特徵為，其含有的寡醣類混合物中，六醣劃分佔有 15 至 25%。

六、申請專利範圍

4. 根據申請專利範圍第 3 項之寡醣類的混合物，特徵為其含有 8 至 15% 的六醣 $\triangle$ IIa-II_s-Is 於寡醣類混合物中之六醣劃分中。
5. 根據申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之寡醣類的混合物，特徵為其呈現抗-Xa 活性為介於 150 IU/毫克與 200 IU/毫克間。
6. 根據申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之寡醣類的混合物，特徵為其呈現抗-IIa 活性為少於 5 IU/毫克特別是於 0.5 至 3.50 IU/毫克。
- 10 7. 根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之寡醣類的混合物，特徵為其呈現抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例為大於 50 且特別是大於 100。
8. 根據申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項之寡醣類的混合物，特徵為其具有平均分子量為介於 2000 與 3000 道爾頓間且特別是介於 2400 至 2650 Da 者。
- 15 9. 根據申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之寡醣類的混合物，特徵為其呈現抗-Xa 活性為介於 150 與 200 IU/毫克間，抗-IIa 活性為介於 0.5 與 3.5 IU/毫克間，與平均分子量為介於 2400 與 2650 Da 間。
- 20 10. 一種製備根據申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項之寡醣類的混合物之方法，其間，肝素的苯甲基酯的季銨鹽是於帶有 pKa 值大於 20 的強有機鹼存在下的有機介質內進行解聚反應，特徵為，所用的有機鹼包括磷并 (phosphazene) 族化合物，特別是於含有少於 0.6% 的水

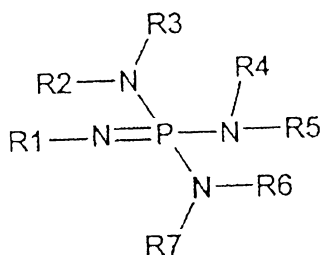
六、申請專利範圍

分之二氯甲烷溶液內進行。

11.根據申請專利範圍第 10 項之方法，係供製備根據申請專利範圍第 1 項的寡醣類，特徵為其中水含量為少於 0.3%且較適當的為少於 0.2%。

5 12.根據申請專利範圍第 10 或 11 項的製備方法，特徵為，肝素的苯甲基酯的季銨鹽為苯銨松寧、鯨蠟基吡啶鎘或鯨蠟基三甲基銨鹽。

10 13.根據申請專利範圍第 10 或 11 項之製備方法，特徵為，磷井類(phosphazenes)一族的鹼類為具有下之化學式者：



15

其中 R_1 至 R_7 的基為相同或相異基，且代表含有 1 至 6 個碳原子之直鏈或支鏈型式烷基。

14.根據申請專利範圍第 10 或 11 項之製備方法，特徵為，強鹼/酯之莫耳比例為介於 0.2 與 5 間，且較佳為介於 0.6 與 2 間。

20 15.根據申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項的由肝素製備寡醣類的方法，係包括進行下列步驟：

a) 藉由與氯苯銨松寧(benzethonium chloride)的作用將肝素鈉進行轉鹽化反應(transalification)，

六、申請專利範圍

- b) 將藉由苯甲基氯的作用產生的苯銨松寧肝素化物
進行酯化反應，
- c) 將製得的苯甲基酯進行轉鹽化反應製成季銨鹽，
- d) 將根據申請專利範圍第 10 或 11 項定義的方法製得
5 之肝素的苯甲基酯的季銨鹽進行解聚反應，
- e) 將季銨鹽轉變成鈉鹽，
- f) 利用鹼(例如氫氧化鈉)的作用進行肝素的選擇性皂
化反應，
- g) 進行選擇性純化反應，特別是利用氧化劑(例如過
10 氧化氫)的作用。
- 16.根據申請專利範圍第 15 項的方法，特徵為步驟 a)的反
應是在 15 至 25°C 的溫度範圍間、鹽/肝素的莫耳比例為
介於 3 與 4 間的條件下，以過量的氯苯銨松寧作用肝素
鈉的方式進行。
- 15 17.根據申請專利範圍第 15 項的方法，特徵為步驟 b)的酯
化反應是在氯化的有機溶劑(例如氯仿或二氯甲烷)中，
介於 25 至 45°C 的溫度間(較佳為介於 30 與 40°C 的溫度
間)進行，然後將呈現鈉鹽型式的酯，使用 10%重量計
的醋酸鈉之酒精(例如甲醇)溶液，經沈澱作用被回收，
20 對每體積之反應混合物使用 1 至 1.2 體積的酒精。
- 18.根據申請專利範圍第 15 或 17 項的方法，特徵為肝素的
苯甲基酯的季銨鹽之酯化程度為介於 50 與 100%間，
且較好為介於 70 與 90%間者。
- 19.根據申請專利範圍第 15、17 或 18 項的方法，特徵為

六、申請專利範圍

對每一份重的肝素之苯銨松寧鹽，係使用 0.5 至 1.5 份重的苯甲基氯，進行介於 10 與 35 小時間之反應。

20. 根據申請專利範圍第 15 項的方法，特徵為步驟 c) 的轉鹽化反應是利用季銨鹽氯化物進行且較佳地是利用氯苯銨松寧、鯨蠟基吡啶鎘氯或鯨蠟基三甲基銨氯，於水溶液介質中，在介於 10 與 25°C 間的溫度下進行。

21. 根據申請專利範圍第 20 項的方法，特徵為：季銨氯化物/肝素的苯甲基酯的鈉鹽之莫耳比例為介於 2 與 3 間。

22. 根據申請專利範圍第 15 項的方法，特徵為：將解聚的肝素的苯甲基酯的季銨鹽轉變成其鈉鹽(步驟 e)，是以醋酸鈉的酒精性溶液處理反應介質，且宜為使用 10% 在甲醇中之醋酸鈉溶液(重量/容量)，在介於 15 與 25°C 間的溫度下進行。

23. 根據申請專利範圍第 15 項的方法，特徵為，皂化反應(步驟 f) 是使用鹼金屬氫氧化物(例如氫氧化鈉、氫氧化鉀或氫氧化鋰)，於水溶液介質中，在介於 0 與 20°C，且宜為介於 0 與 10°C 間的溫度下進行。

24. 根據申請專利範圍第 23 項的方法，特徵為，係使用 1 至 5 莫耳當量的鹼金屬氫氧化物，且宜為使用 1 或 2 莫耳當量的氫氧化鈉進行。

25. 根據申請專利範圍第 15 項的方法，特徵為，純化作業(步驟 g) 是藉由過氧化氫，在水溶液介質中，於 10 至 50°C 的溫度且宜於介於 20 與 40°C 的溫度下進行。

六、申請專利範圍

- 26.根據申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項的寡醣類，作為醫藥品。
- 27.根據申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項的寡醣類，作為具有抗血栓的活性之醫藥品。
- 5 28.根據申請專利範圍第 26 或 27 項的醫藥品，用於預防或治療靜脈的與動脈的血栓，深部靜脈血栓，肺栓塞，不穩定的心絞痛，心肌梗塞，心臟缺血，周圍動脈的阻塞性疾病與心房肌纖維顫動，平滑肌細胞的增殖，動脈粥瘤硬化與動脈硬化，藉調節血管生成與生長因子而供
- 10 治療與預防癌症，與供治療與預防糖尿病的疾病，例如糖尿病性視網膜病變與腎病變。
- 29.一種醫藥組成物，其係包含至少一種根據申請專利範圍 26 所定義之醫藥品與一種或多種藥學的惰性賦型劑或媒質物或添加物。
- 15 30.根據申請專利範圍第 29 項的醫藥組成物，特徵為其包含經由皮下或靜脈內注射施用之溶液類。
- 31.根據申請專利範圍第 29 項的醫藥組成物，特徵為其包含一種用於經由肺部吸入投與之配方。
- 32.根據申請專利範圍第 29 項的醫藥組成物，特徵為其包
- 20 含經由口服投與之配方。
- 33.根據申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項定義之多醣類的混合物，其可利用根據申請專利範圍第 15 項中定義的方法取得。

(一)、本案指定代表圖為：第____圖（無）

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無