

發明專利說明書 200522970

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：9312(97P)

C08B37/10

※申請日期：93-7-23

※IPC 分類：A61K31/727

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P7/02

源自肝素之寡糖混合物，其製備及含其之醫藥組成物

OLIGOSACCHARIDE MIXTURES DERIVED FROM HEPARIN,
PREPARATION THEREOF AND PHARMACEUTICAL
COMPOSITIONS CONTAINING THEM

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文)

阿凡提斯藥品法國公司

AVENTIS PHARMA S.A.

代表人：(中文/英文)

馬迦烈/LE PENNEC, MAGALI

住居所或營業所地址：(中文/英文)

法國安東尼市雷蒙德亞諾街 20 號

20 avenue Raymond Aron, 92160 ANTONY, France

國籍：(中文/英文)

法國/FRANCE

三、發明人：(共3人)

姓名：(中文/英文)

1. 勞弗克/LAUX, VOLKER

2. 莫皮耶/MOURIER, PIERRE

3. 費克莉/VISKOV, CHRISTIAN

國籍：(中文/英文)

1. 為德國/Germany

2.和 3.為法國/France

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

法國 FR;西元 2003 年 7 月 24 日;0309041

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

2.和 3.為法國/France

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

法國 FR;西元 2003 年 7 月 24 日;0309041

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種衍生自肝素之寡糖混合物，其平均分子量為 1800 至 2400 道爾吞，其特徵為高抗-Xa(aXa)活性，且沒有抗
5 Ila(aIIa)活性，並有關其製法與含其之醫藥組成物。

肝素為一種來自動物之硫酸化黏多糖混合物，特別利用其抗凝血及抗血栓性質。

然而，肝素之缺點在於其使用條件受限制。特定言之，其高度抗凝血活性(aIIa)可能導致出血(Seminars in Thrombosis and
10 Hemostasis, vol 5 sup. 3 (1999))。

目前出現在市面上之低分子量肝素(尤其指肝素酯經鹼性去聚合化所得者)，如：抑帕林(Enoxaparin)，亦具有相當高 aIIa 活性。

更近來，極低分子量之肝素已說明於先前技藝中。例如：專利案 US 6 384 021 中，其產品之抗-Xa 活性為 100 至 120 IU/mg
15 之間，抗-IIa 活性為 2 至 8 IU/mg 之間。國際申請案 WO 02/08295 與 WO 2004/033503 中，其產品之抗-Xa 活性特別在 100 至 190 IU/mg 之間，其抗-IIa 活性則低於 5 IU/mg。然而，此等極低分子量肝素當沒有(或實質上沒有)抗-IIa 活性時，其抗-Xa 活性均
20 無法有效高於 190 IU/mg (IU = 國際單位)。

"實質上沒有抗-IIa 活性"一詞(換言之實質上沒有出現抗-IIa 活性)意指其活性低於 0.2 IU/mg。

【發明內容】

25 本發明一項主題為對活化因子(因子 Xa)具有極高選擇活性，同時沒有(或實質上沒有)抗 IIa 活性之寡糖混合物。

因此本發明一項主題為具有肝素之多醣組成之一般結構式

行。其結果使用 GPC6 軟體計算(Perkin Elmer)。

5 抗-Xa 活性係利用醯胺分解法，於產色性受質上，依據 Teien 等人說明於 Thromb. Res., 10, 399-410 (1977)之原理測定。該分析法係依據歐洲藥典(European pharmacopea)所說明低分子量肝素之專題論文中之方法進行，但其中再組成緩衝液:含白蛋白之 tris-NaCl 緩衝液，pH 7.4，改為聚乙二醇 6000 (PEG 6000)。抗 Xa 活性係相對於測得活性為 140 至 180 U/mg (乾重)之標準物極低分子量肝素(VLMWH)測定。

10 標準物 VLMWH 之活性係相對於國際低分子量肝素標準物測定。此標準物 VLMWH 係依據專利申請案 WO WO 02/08 295，特定言之 WO 2004/033503 之教示製備。標準物 VLMWH 之活性係相對於國際低分子量肝素標準物測定。

15 抗-IIa 活性係利用醯胺分解法，於產色性受質上，依據歐洲藥典(European pharmacopea)所說明低分子量肝素之專題論文中之方法進行。aIIa 活性係相對於測得活性為 2.1IU/mg 之標準物極低分子量肝素(VLMWH)測定。標準物 VLMWH 之活性係相對於國際低分子量肝素標準物測定。

20 根據較佳具體實施例，根據本發明寡糖混合物包含 20%至 100%六醣部份。特定言之，此混合物包含 30%至 60%六醣部份。

此外，根據本發明混合物中六醣 Δ IIa-II_s-Is 含量占寡糖混合物中六醣部份之 20%至 70%。特定言之，此部份 Δ IIa-II_s-Is 含量占六醣部份 25%至 50%。

25 六醣部份之百分比可採用高壓液相層析法，於 TSK G3000 XL 與 TSK G2000 XL 管柱上分析測定，或經由製備性分離六醣部份測定。

此時，混合物係於填充聚丙烯醯胺瓊脂糖型凝膠之管柱上層析。使用碳酸氫鈉溶液溶離混合物。較佳者，該碳酸氫鈉溶液

為 0.1 mol/l 至 1 mol/l 溶液。甚至更佳者，該分離作用係在 1 mol/l 之濃度下進行。檢測法係採用 UV 分光計進行(254 nm)。分離後，含六醣部份之碳酸氫鈉溶液經冰醋酸中和。溶液減壓濃縮，得到濃度超過 30%重量比之乙酸钠。添加 3 至 5 倍體積之甲醇，使六醣部份沉澱。六醣部份經 No.3 熔結玻璃漏斗過濾回收。所得六醣混合物經高效液相層析法(HPLC)分析，測定六醣 Δ IIa-II_s-Is 含量。六醣 Δ IIa-II_s-Is 可利用製備性 HPLC 或親和性層析法，於抗凝血酶 III 賽弗洛斯(sepharose)管柱上，依據習此相關技藝之人士已知之技術單離 (M. Hook, I. Bjork, J. Hopwood 與 U. Lindahl, F.E.B.S letters, vol 656(1) (1976))。

較佳者，根據本發明混合物之平均分子量為 1900 至 2200 道爾吞之間，特定言之 1950 至 2150 道爾吞。

根據較佳具體實施例，根據本發明之寡糖混合物之特徵為其抗-Xa 活性在 190 IU/mg 至 410 IU/mg 之間，且沒有(或實質上沒有)抗-IIa 活性。最特定言之，抗-Xa 活性在 200 至 300 IU 之間。

因此，最特定言之，本發明一項主題為具有下列特性之混合物：

- 平均分子量在 1950 至 2150 道爾吞之間，
- 抗-Xa 活性在 190 IU/mg 至 410 IU/mg 之間，且沒有(或實質上沒有)抗-IIa 活性，
- 其包含 30 至 60%六醣部份，其中包含 25%至 55% Δ IIa-II_s-Is 部份。

根據本發明寡糖混合物之活性係利用下文中說明之極特別方法取得。習此相關技藝之人士已知多醣混合物之生理化學性質及其所衍生之活性與製造方法有關(J. Med. Chem. 33(6) 1639-2093 (1990))。

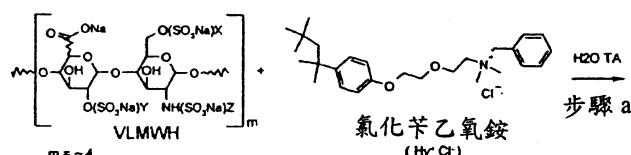
根據本發明寡糖混合物之製法係採用極低分子量肝素

(VLMWH)之苯甲基酯之四級銨鹽，於有機介質中進行去聚合化，此(VLMWH)本身係根據專利申請案 WO 02/08295 與 WO 2004/033503 之教示製備。其一般而言係有關極低分子量肝素之再去聚合作用，該肝素本身係特別由酯化之肝素，於強鹼之存在下，較佳為於二氯甲烷之存在下，及於 3%以下水之存在下經去聚合化而製得。

於本發明中作為起始物之 VLMWHs 特定言之係依據專利申請案 WO 02/08295 與 WO 2004/033503 說明之方法製備。

作為起始物之 VLMWHs 特別具有高於 140 IU/mg 之 aXa 活性，aIIa 活性低於 5 IU/mg，平均分子量在 2000 至 3000 道爾吞之間。aXa 活性係相對於測得活性 158 IU/mg 之標準物 VLMWH 測定。標準物 VLMWH 之活性係相對於國際低分子量肝素標準物測定。

如上述方法製得之起始物 VLMWHs 係使用 pKa 值最好高於 20 之強有機鹼進行再去聚合化(較佳之磷腈-家族有關性質係由例如：Schwesinger 等人之 Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987)或 R.Schwesinger 等人之 Angew. Chem. 105, 1420 (1993)定義)。然後，由去聚合化之 VLMWH 之苯甲基酯之四級銨鹽轉化成鈉鹽，殘留之酯經皂化後，所得產物可視需要純化。下列反應圖說明本發明：

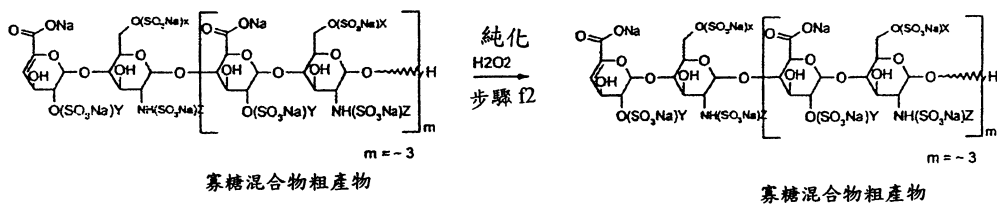
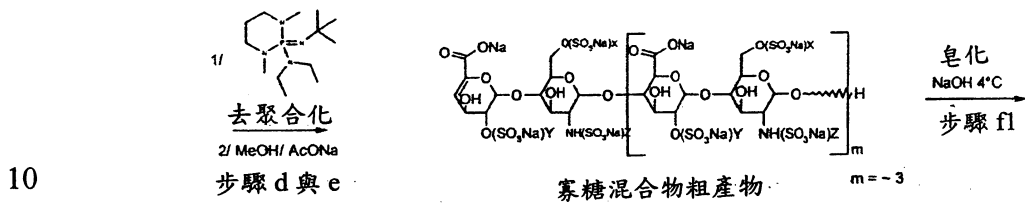
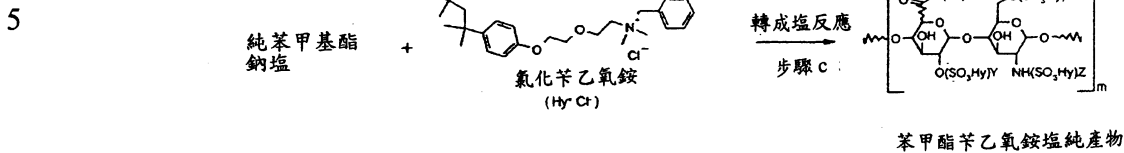
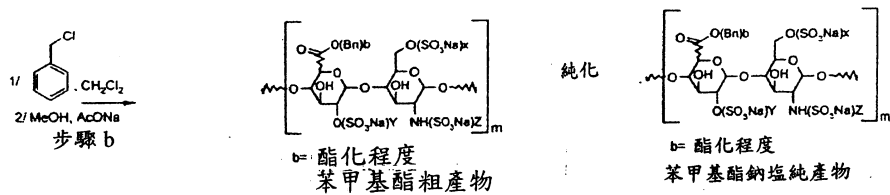


$n = X + Y + Z$ (平均雙糖之總硫酸化程度)

25 X = 該位置之硫酸化程度，其餘由 H 基團代表

Y = 該位置之硫酸化程度，其餘由 H 基團代表

Z = 該位置之硫酸化程度，其餘由 COCH₃ 基團代表



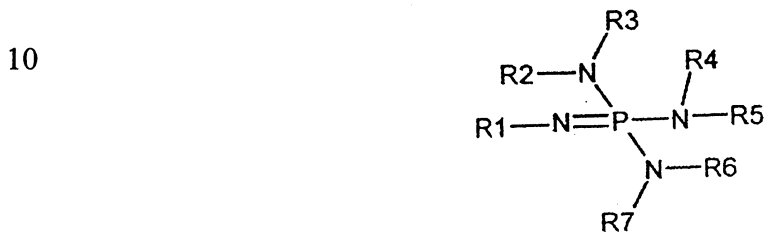
15 因此本發明一項目的亦為一種製備如上述定義寡糖混合物之方法，其中由極低分子量肝素(其 aXa 活性高於 140 IU/mg，aIIa 活性低於 5 IU/mg，平均分子量在 2000 至 3000 道爾吞之間)進行下列化學反應：

- a) 與氯化苄乙氧銨進行轉成鹽反應，得到苄乙氧銨肝素鹽，
- 20 b) 所得苄乙氧銨肝素鹽與苯甲基氯進行酯化反應，以乙酸鈉之醇溶液處理，得到極低分子量肝素之苯甲基酯之鈉鹽，
- c) 所得苯甲基酯進行轉成鹽反應及產生四級銨鹽，最好呈苄乙氧銨、鯨蠟基吡啶鎊或鯨蠟基三甲基銨鹽，
- d) 利用 pKa 值最好高於 20 之強有機鹼進行去聚合化，以得到去
- 25 聚合化之極低分子量肝素，
- e) 轉化去聚合化之極低分子量肝素之四級銨鹽形成鈉鹽，
- f) 殘留之酯皂化，可視需要純化。

本發明中，磷腈鹼在去聚合化步驟期間(步驟 d)之高選擇性最特定言之，意外地可用於增加寡糖混合物中對 ATIII 具有親和性之序列含量。較佳者，強鹼/酯莫耳比例為 0.2 至 5 之間，更特定言之 0.6 至 2 之間。

- 5 為了使對 ATIII 具有親和性之序列達最佳選擇性及最大保留性，當相對於 VLMWH 之苯甲基酯苄乙氧銨鹽使用 1 莫耳當量磷腈鹼操作時，其水含量最好低於 0.3%。

磷腈家族之鹼類最好如下式：



- 15 其中基團 R_1 至 R_7 可相同或相異，代表 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基，其中 R_3 與 R_4 若適當時，可與其所附接之 -N-P-N-基團共同形成 6 員雜環。特定言之，本發明一項主題為如上述定義之方法，其中去聚合化步驟 d)中所使用之鹼為 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,3,2-重氮磷(diazaphosphorine)(正式命名法:1,3,2-重氮磷(diazaphosphorin)-2-胺, 2-[(1,1 二甲基乙基)亞胺基]-N,N-二乙基-1,2,2,2,3,5,6-八氫-1,3-二甲基)。

- 20 進行轉成鹽化反應步驟 a)時，最好由過量氯化苄乙氧銨與 VLMWH 鈉，於 15 至 25°C 之溫度範圍下反應。鹽/肝素鈉莫耳比例宜在 2.5 至 3.5 之間。

- 25 進行酯化步驟 b)時，最好在有機氯化溶劑中(如：氯仿或二氯甲烷)，於 25 至 45°C 之溫度間，最好在 30 至 40°C 之間進行。然後使用 10% 重量比乙酸鈉，於醇中(如：甲醇)，使酯呈鈉鹽型

式回收。通常每份體積反應介質使用 1 至 1.2 份體積之醇。調整苯甲基氣之用量及反應時間，以得到酯化度在 40%至 100%之間，最好在 70%至 90%之間。每份重量比肝素之苄乙氧銨鹽最好使用 0.5 至 1.5 份重量比苯甲基氣。同樣地，該反應時間最好在 10 至 35 小時之間。

因此，根據本發明方法所使用肝素之苯甲基酯之四級銨鹽之酯化度在 40%與 100%之間，最好在 70 與 90%之間。

去聚合化之肝素之苯甲基酯之四級銨鹽轉化成鈉鹽之過程通常使用乙酸鈉之醇溶液，最好為 10%乙酸鈉之甲醇溶液(重量/體積)，於 15 至 25°C 之溫度間處理反應介質。

所添加之乙酸鹽重量當量最好為接續用於去聚合化反應之肝素之苯甲基酯之四級銨鹽質量之 3 倍。所得 VLMWH 之苯甲基酯之四級銨鹽最好為苄乙氧銨、鯨蠟基吡啶鎊或鯨蠟基三甲基銨鹽。

轉成鹽化反應步驟 c) 係使用四級氯化銨，最好使用氯化苄乙氧銨、鯨蠟基吡啶鎊或鯨蠟基三甲基銨鹽，於水性介質中，於 10 至 25°C 之溫度間進行。肝素之苯甲基酯之四級氯化銨/鈉鹽之莫耳比例為 2.5 至 3.5 之間。

皂化反應通常使用鹼金屬氫氧化物如：氫氧化鈉、氫氧化鉀或氫氧化鋰，於水性介質中，於 0 至 20°C 之溫度間進行，通常在 0 至 10°C 間進行。通常使用 1 至 5 莫耳當量鹼金屬氫氧化物。該皂化反應最好在 1 至 2 莫耳當量鹼金屬氫氧化物之存在下進行。

終產物可視需要依任何用於純化去聚合化肝素之已知方法純化(例如：EP 0 037 319 B1)。較佳者，該純化法係利用過氧化氫，於水性介質中，於 10 至 50°C 之溫度間進行。此操作法最好在 20 至 40°C 間進行。

根據本發明呈鈉鹽之混合物可轉化成另一種鹼金屬或鹼土

金屬之鹽。由一種鹽轉化成另一種鹽之過程可視需要採用專利案 FR 73/13580 中說明之方法進行。

5 本發明特別可以增加六糖 Δ IIa-II_s-Is 之含量。當低分子量肝素經由製成該肝素之方法再去聚合化時，習此相關技藝之人士已知該所得產物之抗-Xa 活性會大幅下降至零為止。當採用製得抑帕林(Enoxaparin)、法帕林(Fraxiparin)、法格明(Fragmin)、英諾普(Innohep) (或咯帕林(Logiparin))、諾米弗(Normiflo)、抑普利(Embollex) (或賽帕林(Sandoparin))、弗塞林(Fluxum)(或明達通(Minidaltan))、克發林(Clivarin)與希伯(Hibor)之方法時，若
10 此等 LMWHs 經由其原始製法進行再去聚合化時，則會觀察到此現象。其係此等方法在保留 ATIII 位置上之低選擇性所致。

本發明中，若使用磷脲去聚合化法所衍生之 VLMWH 作為起始物時，則會扭轉此現象。寡糖混合物之 aXa 活性會提高，甚至超過用於製造 VLMWH 之肝素。其係磷脲鹼保留對 ATIII
15 具有親和性之值得注意之選擇性所致。

該方法之此特性亦特別出現在所得寡糖混合物之平均分子量上。例如：平均分子量 2400 道爾吞之 VLMWH 經去聚合化時，得到平均分子量 2000 Da 之寡糖混合物。已發現，對 ATIII 具有親和性之序列(六糖與八糖)會因磷脲鹼之作用而保留，結果破壞
20 及消除其他序列，產生平均分子量傾向於無法去聚合化物質，亦即六糖 Δ IIa-II_s-Is 之平均分子量(1834 g/mol)。應指出，使用磷脲鹼進行肝素去聚合化步驟時，平均分子量由約 15 000 Da 變成約 2400 Da。

25 另一種方法中，根據本發明提高活性與對因子 Xa 之選擇性之方法一般亦可用於低分子量肝素。例如：可述及抑帕林(Enoxaparin)、法帕林(Fraxiparin)、法格明(Fragmin)、英諾普(Innohep)(或咯帕林(Logiparin))、諾米弗(Normiflo)、抑普利

(Embollex)(或賽帕林(Sandoparin))、弗塞林(Fluxurn)(或明達通(Minidaltan))、克發林(Clivarin)與希伯(Hibor)。其亦可為某些說明於 US 6 384 021 (2000-4000 Da)或 WO 02/08295(1500 至 3000 Da)中抗-Xa 活性低於 140 IU/mg(特定言之 100 至 140 IU/mg 之間)之極低分子量肝素。

此方法之特性反映在寡糖混合物之平均分子量意外產生之抗-Xa 活性上($190 \text{ IU/mg} < aXa < 450 \text{ IU/mg}$; $1800 \text{ Da} < MW < 2400 \text{ Da}$)。

根據本發明之特定具體實施例，該寡糖混合物傾向因子 Xa 之選擇性可經由排除雙醣及四醣部份(對 ATIII 沒有專一結合性之部份)而進一步提高。此時，混合物於填充聚丙烯醯胺瓊脂糖型凝膠或聚丙烯醯胺凝膠之管柱上層析。混合物使用碳酸氫鈉溶液溶離。較佳者，該碳酸氫鈉溶液為 0.1 mol/l 至 1 mol/l。甚至更佳者，該分離作用係在 1 mol/l 之濃度下進行。檢測法係採用 UV 分光計進行(254 nm)。排除雙醣與四醣部份後，含寡糖混合物之碳酸氫鈉溶液經冰醋酸中和。溶液減壓濃縮，得到濃度超過 20%重量比之乙酸鈉。添加 3 至 5 倍體積之甲醇，使寡糖混合物沉澱。高親和性寡糖混合物經過濾回收。若必要時，可於合適管柱上脫鹽純化。實例 6 說明此另一種方法，且可得到抗-Xa 活性超過 400 IU/mg 之極低分子量肝素。

因此本發明一項主題亦為如上述定義製備寡糖混合物之方法，該寡糖混合物對因子 Xa 具有提高之選擇性，其中亦利用層析法，尤其利用填充聚丙烯醯胺瓊脂糖型凝膠之管柱排除雙醣與四醣部份。

根據本發明混合物可用為醫學產品。

本發明寡糖混合物可用為抗血栓劑。特定言之，其適用於治療或預防靜脈與動脈血栓、深部靜脈血栓、肺栓塞、不穩定型

心絞痛、心肌梗塞、心臟絕血、周邊動脈之閉鎖性疾病與心室纖維顫動。其亦適用於預防與治療平滑肌細胞增生、動脈粥樣硬化與動脈硬化，藉由調變新血管形成與生長因子來治療與預防癌症，及治療與預防糖尿病如：視網膜病變及糖尿病性腎病變。

5

本發明亦有關一種醫藥組成物，其包含作為活性成分之式(I)混合物，可視需要與一種或多種惰性賦形劑混合。

醫藥組成物為例如：經皮下或經靜脈內注射。根據本發明其他醫藥組成物亦可用於肺部投藥(吸入)或經口投藥。

10

其劑量可隨患者年齡、體重、健康狀況而定。對成人而言，通常為每天經肌內或皮下途徑投與 20 至 100 mg。

【實施方式】

下列實例說明本發明，但並未加以限制。

15

製法 1：aXa 活性等於 158.8 IU/mg 之起始物極低分子量肝素之製法

用為實例 1 起始物之極低分子量肝素(VLMWH)係依據專利申請案 WO 2004/033503 之方法，由肝素鈉進行如上述定義之步驟 a 至 f，進行製備，去聚合化步驟係於 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,3,2-重氮磷之存在下，於低於 0.6% 水之存在下進行。

20

所得極低分子量肝素之特性

所得去聚合化肝素之特性如下：

25

平均分子量：2400 道爾吞

抗-Xa 活性：158.8 IU/mg

抗-IIa 活性：3.1 IU/mg

抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：51

製法 2：aXa 活性等於 158 IU/mg 之起始物極低分子量肝素製法

5 用為實例 2、3、4 與 5 起始物之極低分子量肝素(VLMWH)係依據專利申請案 WO 2004/033503 之方法，由肝素鈉進行如上述定義之步驟 a 至 f，進行製備，去聚合化步驟係於 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,3,2-重氮磷之存在下，於低於 0.6%水之存在下進行。

10

所得極低分子量肝素之特性

所得去聚合化肝素之特性如下：

平均分子量：2450 道爾吞

抗-Xa 活性：158 IU/mg

15

抗-IIa 活性：2.1 IU/mg

抗-Xa 活性/抗-IIa 活性比例：75

製法 3：VLMWH，苄乙氧銨鹽

VLMWH 形成苄乙氧銨鹽之轉成鹽化反應(相當於該製法之步驟 a))：

20

取依據製法 1 製得之 12.53 g (20.7 mmol) VLMWH 鈉鹽置入 500 ml 錐形燒瓶 A 中，溶於 85 ml 水中(黃色溶液)。

取 31.62 g (70.5 mmol)氯化苄乙氧銨置入含 250 ml 水之 100 ml 錐形燒瓶 B 中(無色溶液)。

25

取 B 之內容物倒至 A 中，於室溫下攪拌混合物約 1 小時。所得混合物靜置沉澱約 1 小時。上澄液棄置，然後換上同體積水(250 ml)。攪拌混合物約 15 分鐘，靜置沉澱約 30 分鐘。上澄

液棄置，然後換上同體積水(250 ml)。攪拌混合物約 15 分鐘後，過濾。濾塊經 200 ml 水洗滌 3 次。米色潮濕固體經抽吸瀝乾，然後於 80°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 35.56 g VLMWH 苜乙氧銨鹽。

5 所得產率 89%。

製法 4

VLMWH 形成苜乙氧銨鹽之轉成鹽反應(相當於製法之步驟 a)：

10 取依據製法 2 所得之 17.93 g(30.2 mmol) VLMWH 鈉鹽置入 1 升錐形燒瓶 A 中，溶於 120 ml 水(黃色溶液)。

取 45 g (0.1 mol)氯化苜乙氧銨置入含 360 ml 水之 500 ml 錐形燒瓶 B 中(無色溶液)。

15 將 B 之內容物倒至 A 中，於室溫下攪拌混合物約 1 小時。所得混合物靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之水(500 ml)。攪拌混合物約 15 分鐘，靜置沉澱約 30 分鐘。棄置上澄液，然後換上等體積之水(500 ml)，攪拌混合物約 15 分鐘後，過濾。濾塊經 200 ml 水洗滌 3 次。潮濕之米色固體抽吸瀝乾後，於 80°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 48 小時。得到 49.5 g VLMWH 苜乙氧銨鹽。

20 所得產率為 87%。

實例 1：

25 依據本發明之製法製得極低分子量肝素(VLMWH)，其包含之步驟為 77%酯化反應，及使用衍生自磷腓之鹼，於無水介質中之去聚合化步驟。

VLMWH 之酯化反應(製法之步驟 b)：

取依據製法 3 製得之 35.39 g (18.3 mmol) VLMWH 苜乙氧
銨鹽(水含量 0.20%)溶於 183.3 g 無水二氯甲烷中，置入 500 ml
三頸燒瓶中。於 30°C 之溫度下添加 29.5 ml(25.7 mmol)苜甲基
氣。於 30°C 下反應約 23 小時後之酯化反應程度為 77%。冷卻
5 至室溫(22±3°C)後，將反應混合物倒至 490 ml 10%乙酸鈉之甲醇
溶液中。攪拌混合物約 1 小時後，靜置沉澱約 1 小時。棄置上
澄液，然後換上等體積之甲醇(250 ml)。攪拌混合物約 30 分鐘
後，靜置沉澱約 45 分鐘。棄置上澄液，然後，換上等體積之甲
醇(250 ml)。混合物靜置沉澱約 16 小時。棄置上澄液後，換上
10 等體積之甲醇(350 ml)。攪拌混合物約 5 分鐘，懸浮液過濾。濾
塊經 50 ml 甲醇洗滌 2 次。抽吸瀝乾，於 40°C 下減壓乾燥(6 kPa)
約 18 小時。得到 34.48 g 粗產物 VLMWH 苜甲基酯鈉鹽，酯化
反應程度 77%。

15 **VLMWH 苜甲基酯鈉鹽之純化法(製法之步驟 b)) :**

取 34.48 g 粗產物 VLMWH 苜甲基酯鈉鹽溶於 350 ml 10%
NaCl 水溶液中。溶液倒至 1.57 升甲醇中。攪拌懸浮液約 40 分
鐘後，靜置沉澱約 16 小時。棄置上澄液後，換上等體積之甲醇
(1.5 L)。攪拌此混合物約 1 小時，靜置沉澱約 1.5 小時。棄置上
20 澄液後，換上等體積之甲醇(1.2 L)。攪拌此混合物約 15 分鐘後，
過濾。濾塊經 50 ml 甲醇洗滌 3 次。潮濕之白色固體抽吸瀝乾後，
於 40°C 下減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 6.07 g VLMWH 苜甲
基酯鈉鹽。

酯化反應產率為 50%。

25

**VLMWH 苜甲基酯鈉鹽形成苜乙氧銨鹽之轉成鹽反應(製法之
步驟 c)) :**

取 6 g (9.14 mmol)VLMWH 苯甲基酯鈉鹽溶於含 40 ml 水之 250 ml 錐形燒瓶 A 中。同時另取 13.93 g (31 mmol)氯化苄乙氧銨置入含 110 ml 水之 250 ml 錐形燒瓶 B 中。

5 取 B 之內容物倒至 A 中。於室溫下(22±3°C)攪拌懸浮液約 1 小時後，靜置沉澱 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之水(140 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，靜置沉澱 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之水(140 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，靜置沉澱約 30 分鐘。棄置上澄液與，換上等體積之水(140 ml)。攪拌此混合物約 5 分鐘後，過濾。濾塊經 50 ml 水洗滌 3 次。抽吸瀝乾後，於 80°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 17.43 g VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽。

產率為 100%。

VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽於無水介質中之去聚合化反應：
15 無法檢測之水含量 < 0.01% (製法之步驟 d)：

取依據製法 2 製得之 17.43 g (9.14 mmol) VLMWH 置入 250 ml 含 122 ml 無水二氯甲烷之三頸燒瓶中。添加 17.4 g 4 埃分子篩。於室溫(22±3°C)與氬氣下攪拌混合物約 18 小時。

20 將溶液移至 250 ml 三頸燒瓶中，分離混合物中之分子篩。添加 2.64 ml (9.14 mmol)2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,3,2-重氮磷(diazophosphorine)，於 22±3°C 與氬氣下攪拌混合物 24 小時。

四級銨鹽形成鈉鹽之轉化法(製法之步驟 e))

25 同時另於 2 升錐形燒瓶中製備 730 ml 10% 乙酸钠之甲醇溶液。添加 8.71 g Hyflo supercel 寅式鹽(Celite)至溶液中。反應混合物倒至甲醇溶液中，同時保持溫度在約 4°C。於此溫度下攪拌

懸浮液約 15 分鐘。混合物於室溫下靜置沉澱約 45 分鐘，棄置上澄液後，換上等量甲醇(450 ml)。攪拌此混合物 15 分鐘後，靜置沉澱約 45 分鐘。再度棄置上澄液後，換上等量甲醇(420 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘後，經 No.3 熔結玻璃漏斗過濾。濾塊經 70 ml 甲醇洗滌 2 次，抽吸瀝乾後，於 50°C 下減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到含 4.35 g 粗產物去聚合化 VLMWH (鈉鹽)之寅式鹽(8.71 g)。

產率為 72.5%。

10 **粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽之皂化反應(製法之步驟 f1)):**

取含 4.35 g(6.63 mmol)粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)之寅式鹽溶於 46 ml 水中，經 No.3 熔結玻璃漏斗過濾。寅式鹽經 2 份 30 ml 水潤洗。濾液置入 500 ml 錐形燒瓶中。於 4°C 之溫度範圍內添加 823 μ l(9.94 mmol)35% 氫氧化鈉溶液。於此溫度下攪拌混合物約 3 小時。添加 1N HCl 溶液中和介質後，添加 11.5 g NaCl 與 80 ml 甲醇。攪拌約 15 分鐘後，添加 210 ml 甲醇。攪拌懸浮液約 1 小時後，靜置沉澱 30 分鐘。棄置上澄液，換上等體積之甲醇(230 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，靜置沉澱 30 分鐘。棄置上澄液後，換上等量甲醇(210 ml)。攪拌混合物約 15 分鐘後，過濾。濾塊經 9 ml 甲醇洗滌 2 次，抽吸瀝乾後，於 50°C 下減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 2.95g 粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)。

產率為 73.7%。

25 **f)粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽之純化法(製法之步驟 f2)):**

取 1.5g 粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽置入含 16 ml 水之 50 ml 三頸燒瓶中。溶液保持在 40°C 下約 10 分鐘。添加 0.1N 氫

氧化鈉溶液調整 pH 至約 9.7。溶液經 0.45 μm 膜過濾，添加 84 μl 30%過氧化氫水溶液。於室溫下攪拌混合物 2 小時，同時添加 0.1N 氫氧化鈉溶液保持 pH 恆定在 9.7 ± 0.1 。反應混合物經 0.1N HCl 中和，添加 2 g NaCl。攪拌約 10 分鐘後，溶液經 0.45 μm 膜過濾。於 4°C 之溫度範圍內添加 14 ml 甲醇。於室溫下攪拌溶液約 15 分鐘。添加 36 ml 甲醇，攪拌懸浮液約 1 小時。然後停止攪拌，混合物靜置沉澱約 30 分鐘。棄置上澄液(40 ml)，然後添加 40 ml 甲醇至沉澱中，攪拌此混合物約 10 分鐘。再度靜置沉澱約 30 分鐘。棄置上澄液(45 ml)。添加 45 ml 甲醇，然後濾出懸浮液中之沉澱。所得白色濾塊經 2 份 3 ml 甲醇洗滌。潮濕之固體抽吸瀝乾後，於 50°C 之溫度範圍內減壓乾燥(6 kPa)。乾燥約 18 小時後，得到 1.303 g 純產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)。

所得產率為 86.8%。

15 **g) 所得去聚合化之 VLMWH 之特性**

平均分子量：1950 道爾吞

聚合度分佈性指數：1.1

抗-Xa 活性：283 U/mg

aIIa 活性：無法檢測(< 0.2 U/mg)

20

實例 2：

依據本發明之製法製得極低分子量肝素(VLMWH)，其包含之步驟為 49%酯化反應，及使用衍生自磷腈之鹼，於無水介質中之去聚合化步驟。

25

VLMWH 之酯化反應(製法之步驟 b)：

取依據製法 4 製得之 13.29g (7.6 mmol) VLMWH 苄乙氧鎂

鹽溶於 70.43 g 無水二氯甲烷中，置入 100 ml 三頸燒瓶中(反應介質之水含量為 0.073%)。於 30°C 之溫度下添加 12.3 ml (107 mmol) 苯甲基氯。於 30°C 下反應約 7 小時後之酯化反應程度為 49%。冷卻後，將反應混合物倒至 160 ml 12% 乙酸鈉之甲醇溶液中。於室溫下攪拌混合物約 1 小時後，靜置沉澱約 16 小時。棄置上澄液，然後換上等體積之甲醇(100 ml)。攪拌混合物約 1 小時後，靜置沉澱約 1 小時。再度棄置上澄液，然後換上等體積之甲醇(100 ml)。攪拌混合物約 5 分鐘後，過濾。濾塊經 40 ml 甲醇洗滌 2 次。抽吸瀝乾，於 40°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 3.90g 粗產物 VLMWH 苯甲基酯鈉鹽，酯化反應程度 49%。

VLMWH 苯甲基酯(酯化程度 49%)鈉鹽之純化法(製法之步驟 b))：

取 3.90 g 粗產物 VLMWH 苯甲基酯鈉鹽溶於 39ml 10% NaCl 水溶液中。溶液倒至 176 ml 甲醇中。攪拌懸浮液約 15 分鐘後，靜置沉澱約 2 小時。混合物過濾。濾塊再懸浮於 175 ml 甲醇中，攪拌 10 分鐘。混合物過濾，濾塊經 2 份 10 ml 甲醇洗滌。潮濕之白色固體抽吸瀝乾，於 40°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 2.62 g VLMWH 苯甲基酯鈉鹽。

酯化反應期之總產率為 57.3%。

VLMWH 苯甲基酯形成苄乙氧銨鹽之轉成鹽反應(製法之步驟 c))：

取 2.62 g (4.37 mmol)VLMWH 苯甲基酯鈉鹽溶於 20 ml 水中(錐形燒瓶"A")。同時取 5.92 g (13.2 mmol)氯化苄乙氧銨置入含 60 ml 水之錐形燒瓶"B"中。

取"B"之內容物倒至"A"中。於室溫下攪拌懸浮液約 1 小時後，靜置沉澱 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之水(70 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，靜置沉澱 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之水(70 ml)。再攪拌此混合物約 5 分鐘，過濾。濾塊經 3 份 50 ml 水洗滌，抽吸瀝乾後，於 80°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 6.85g VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽。

產率為 99%。苄乙氧銨鹽之水含量為 0.6%。

VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽之去聚合化反應：

10 取 6.80 g (4.3 mmol)VLMWH 置入含 54 ml 無水二氯甲烷之 100 ml 三頸燒瓶中。使混合物到 30°C，攪拌至完全溶解。反應混合物中預估之水含量為約 0.05%。添加 1.25 ml(4.3 mmol)2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,3,2-重氮磷(diazophosphorine)，於 30°C 與惰性蒙氣下攪拌混合物 24 小時。

15

四級銨鹽形成鈉鹽之轉化法(製法之步驟 e)：

同時另於 1 升錐形燒瓶中製備 270 ml 10% 乙酸钠之甲醇溶液。反應混合物倒至甲醇溶液中，同時保持溫度在約 4°C 下。於室溫下攪拌懸浮液約 1 小時。此混合物靜置沉澱 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之甲醇(165 ml)。攪拌此混合物約 1 小時，靜置沉澱 1 小時。再度棄置上澄液後，換上等量甲醇(170 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，過濾。濾塊經 3 份 40 ml 甲醇洗滌，抽吸瀝乾後，於 50°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 2.29 g 粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽。

20

所得產率為 89%。

25

粗產物 VLMWH 鈉鹽之皂化反應(製法之步驟 fl)：

取 2.29 g (3.8 mmol)粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽溶於 23 ml 水中。溶液經 0.8 μm 膜過濾後，置入 100 ml 三頸燒瓶中。於 3°C 之溫度範圍內添加 575 μl (5.73 mmol)30% 氫氧化鈉溶液。於此溫度下攪拌混合物約 2 小時。

- 5 取一半量反應混合物經添加冰醋酸中和後，添加 367 mg 乙酸鈉固體與 13 ml 甲醇。攪拌溶液約 15 分鐘後，添加 65 ml 甲醇。攪拌所得懸浮液約 30 分鐘後，靜置沉澱約 16 小時。棄置上澄液後，換上等量甲醇(36 ml)。攪拌此混合物約 30 分鐘，靜置沉澱約 30 分鐘。棄置上澄液，然後換上等量甲醇(16 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，經 0.22 μm 膜過濾。濾塊經 5 ml 甲醇洗滌 2 次，抽吸瀝乾後，於 50°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 563 mg 粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)。

產率為 52.6%。

- 15 **粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)使用 NaOAc 進行沉澱之純化法(製法之步驟 f2))：**

- 20 取 560 mg 粗產物去聚合化之 VLMWH (鈉鹽)置入含 5.6 ml 水之 100 ml 三頸燒瓶中。此褐色溶液保持在 40°C 下 10 分鐘。添加 0.1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 至 9.7。溶液經 0.45 μm 膜過濾，添加 28 μl 30%過氧化氫水溶液。於室溫下攪拌混合物 2 小時，同時添加 0.1N 氫氧化鈉溶液，保持 pH 恆定在 9.5 \pm 0.1。反應混合物經 0.1N HCl 中和，添加 620 mg NaCl。攪拌 10 分鐘後，溶液經 0.45 μm 膜過濾。於 4°C 之溫度範圍下添加 4.35 ml 甲醇。於室溫下攪拌溶液 15 分鐘。添加 11.2 ml 甲醇。攪拌懸浮液 1 小時。然後停止攪拌，混合物靜置沉澱 1 小時。棄置上澄液(13.5 ml)。添加 13.5 ml 甲醇至沉澱中，攪拌混合物 15 分鐘。再度靜置沉澱約 30 分鐘。棄置上澄液(13 ml)。添加 13 ml 甲醇，

然後濾出懸浮液中沉澱。所得白色濾塊經 2 份 5 ml 甲醇洗滌。潮濕之固體抽吸瀝乾後，於 50°C 之溫度範圍內減壓乾燥(6 kPa)。乾燥 18 小時後，得到 376 mg 純化之去聚合化之 VLMWH (鈉鹽)。

5 所得產率為 67%。

所得去聚合化之 VLMWH 之特性：

抗-Xa 活性：191 IU/mg

平均分子量：2100 Da

10

實例 3：

依據本發明之製法製得極低分子量肝素(VLMWH)，其包含之步驟為 73% 酯化反應，及使用衍生自磷腓之鹼，於無水介質中之去聚合化步驟。

15

VLMWH 之酯化反應(製法之步驟 b)：

取依據製法 4 製得之 13.7 g (7.3 mmol)VLMWH 苄乙氧銨鹽溶於 73.67 g 無水二氯甲烷中，置入 100 ml 三頸燒瓶中(反應介質之水含量為 0.23%)。於 30°C 之溫度下添加 13 ml (113 mmol) 20 苯甲基氯。於 30°C 下反應約 20 小時後之酯化反應程度為 73%。冷卻至室溫後，將反應混合物倒至 210 ml 12% 乙酸鈉之甲醇溶液中。於室溫下攪拌混合物約 30 分鐘後，靜置沉澱約 1.5 小時。棄置上澄液，然後換上等體積之甲醇(140 ml)。攪拌混合物約 15 分鐘後，過濾懸浮液。濾塊經 2 份 100 ml 甲醇洗滌 2 次。抽吸 25 瀝乾，於 40°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 13.3g 粗產物 VLMWH 苯甲基酯鈉鹽，酯化反應程度 73%。

VLMWH 苯甲基酯(酯化程度 73%)鈉鹽之純化法(製法之步驟 b)) :

5 取 13.3 g 粗產物 VLMWH 苯甲基酯鈉鹽溶於 133ml 10% NaCl 水溶液中。溶液倒至 600 ml 甲醇中。攪拌懸浮液約 15 分鐘後，靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液，然後換上等體積之甲醇(400 ml)。攪拌此混合物約 5 分鐘後，過濾。濾塊經 3 份 100 ml 甲醇洗滌。潮濕之白色固體抽吸瀝乾，於 40°C 烘箱中減壓乾燥 (6 kPa) 約 18 小時。得到 2.33g VLMWH 苯甲基酯鈉鹽。

酯化反應產率為 49.6%。

10

VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽之轉成鹽反應(製法之步驟 c)) :

取 2.27 g (3.53 mmol)VLMWH 苯甲基酯鈉鹽溶於含 15 ml 水之 100 ml 錐形燒瓶"A"中。同時取 5.22 g (11.6 mmol)氯化苄乙氧銨置入含 55 ml 水之 100 ml 錐形燒瓶"B"中。

15

取"B"之內容物倒至"A"中。於室溫下攪拌懸浮液約 1 小時後，靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之水(50 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之水(50 ml)。再攪拌此混合物 5 分鐘，過濾。濾塊經 3 份 50 ml 水洗滌，抽吸瀝乾後，於 80°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa) 約 18 小時。得到 5.67g VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽。

20

產率為 98%。所得產物之水含量為 1%。

VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽之去聚合化反應(製法之步驟 d)):

25 取 5.45 g (3.3 mmol) VLMWH 置入含 40 ml 無水二氯甲烷之 100 ml 三頸燒瓶中。混合物中之預估含水量為約 0.1%。使混合物到 30°C。添加 958 μ l (3.3mmol)2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,3,2-重氮磷(diazophosphorine)，於 30°C 與氫

氣下攪拌混合物 24 小時。

四級銨鹽形成鈉鹽之轉化法(製法之步驟 e)：

5 同時另於 500 ml 錐形燒瓶中製備 200 ml 10% 乙酸鈉之甲醇
溶液。反應混合物倒至甲醇溶液中，同時保持溫度在約 4°C 下。
於室溫下攪拌懸浮液約 1 小時。此混合物靜置沉澱約 1 小時。
棄置上澄液後，換上等體積之甲醇(150 ml)。攪拌此混合物約 30
分鐘，靜置沉澱約 30 分鐘。再度棄置上澄液後，換上等量甲醇
10 (150 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，過濾。濾塊經 3 份 50 ml
甲醇洗滌，抽吸瀝乾後，於 50°C 下減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。
得到 1.40 g 粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽。

所得產率為 65.8%。

粗產物去聚合化 VLMWH 鈉鹽之皂化反應(製法之步驟 f1)：

15 取 1.40 g(2.18mmol)粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽溶於
14ml 水中。溶液置入 100ml 三頸圓底燒瓶中。於 4°C 之溫度範
圍內添加 351 μ l(3.5 mmol)30% 氫氧化鈉溶液。於此溫度下攪拌混
合物約 2 小時。此溶液經添加冰醋酸(100%)中和。添加 7g 乙酸
鈉固體與 130 ml 甲醇。攪拌懸浮液 30 分鐘後，靜置沉澱約 1 小
20 時。棄置上澄液後，換上等量甲醇(80 ml)。攪拌此混合物約 30
分鐘，靜置沉澱約 16 小時。棄置上澄液，然後換上等量甲醇(80
ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，經 0.45 μ m 膜過濾。濾塊經 10 ml
甲醇洗滌 2 次，抽吸瀝乾後，於 50°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約
18 小時。得到 1.15 g 粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)(產率
25 89.4%)。

所得產率為 89.4%。

粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)純化法(製法之步驟 f2)：

取 373 mg 粗產物去聚合化之 VLMWH (鈉鹽)置入含 3.7 ml 水之 10 ml 三頸燒瓶中。此溶液保持在 40°C 下 10 分鐘。添加 1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 至約 9.5。溶液經 0.45 μ m 膜過濾，添加 18 μ l 30%過氧化氫水溶液。於室溫下攪拌混合物 2 小時，同時
5 添加 0.1N 氫氧化鈉溶液，保持 pH 恆定在 9.5 \pm 0.1。反應混合物經 0.1 N HCl 中和，添加 430 mg NaCl。攪拌約 10 分鐘後，溶液經 0.45 μ m 膜過濾。於 4°C 之溫度範圍下添加 3 ml 甲醇。於室溫下攪拌溶液 15 分鐘。添加 7.7 ml 甲醇。攪拌懸浮液約 1 小時。然後停止攪拌，混合物靜置沉澱約 40 分鐘。棄置上澄液(10 ml)。
10 添加 10 ml 甲醇至沉澱中，攪拌混合物 15 分鐘。再度靜置沉澱約 30 分鐘。棄置上澄液(10 ml)。添加 10 ml 甲醇，然後經 0.45 μ m 膜濾出懸浮液中沉澱。所得白色濾塊經 4 份 5 ml 甲醇洗滌。潮濕之固體抽吸瀝乾後，於 50°C 之溫度範圍內減壓乾燥(6 kPa)。乾燥約 18 小時後，得到 199 mg 純化之去聚合化之 VLMWH (鈉鹽)。
15

所得產率為 54%。

所得去聚合化之 VLMWH 之特性：

平均分子量：2000·道爾吞

20 聚合度分佈性指數：1.1

抗-Xa 活性：252 IU/mg

實例 4：

25 依據本發明之製法製得 VLMWH，其包含之步驟為 96%酯化反應，及使用 BEMP 之去聚合化步驟。

VLMWH 之酯化反應(製法之步驟 b)：

取依據製法 4 製得之 14.45 g (7.7 mmol) VLMWH 苄乙氧銨

鹽溶於 75.79 g 無水二氯甲烷中，置入 250 ml 三頸燒瓶中(反應介質之水含量為 0.20%)。於 30°C 之溫度下添加 12.4 ml (108 mmol) 苯甲基氯。於 30°C 下反應約 26 小時後之酯化反應程度為 96%。冷卻至室溫後，將反應混合物倒至 180 ml 12% 乙酸鈉之甲醇溶液中。於室溫下攪拌混合物約 30 分鐘後，靜置沉澱約 30 分鐘。棄置上澄液，然後換上等體積之甲醇(150 ml)。攪拌混合物約 15 分鐘後，過濾。濾塊經 2 份 100 ml 甲醇洗滌。抽吸瀝乾，於 40°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 3.67g 粗產物 VLMWH 苯甲基酯鈉鹽，酯化反應程度 96%。

10

VLMWH 苯甲基酯(酯化程度 96%)鈉鹽之純化法(製法之步驟 b)) :

取 3.67 g 粗產物 VLMWH 苯甲基酯鈉鹽溶於 37 ml 10% NaCl 水溶液(含 3.7 g NaCl 之 37 ml 水)中。溶液倒至 167 ml 甲醇中。攪拌懸浮液約 15 分鐘後，靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液，然後換上等體積之甲醇(38 ml)。攪拌此混合物約 5 分鐘後，過濾。濾塊經 30 ml 甲醇洗滌 2 次。潮濕之白色固體抽吸瀝乾，於 40°C 下減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 2.76 g VLMWH 苯甲基酯鈉鹽。

15

20

酯化反應產率為 54.4%。

VLMWH 苯甲基酯形成苜乙氧銨鹽之轉成鹽反應(製法之步驟 c)) :

取 2.83 g (4.29 mmol)VLMWH 苯甲基酯鈉鹽溶於含 20 ml 水之 100 ml 錐形燒瓶"A"中。同時取 6.35 g (14.2 mmol)氯化苜乙氧銨置入含 50 ml 水之 100 ml 錐形燒瓶"B"中。

25

取"B"之內容物倒至"A"中。於室溫下攪拌懸浮液約 1 小時

後，靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之水(60 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之水(60 ml)。再攪拌此混合物約 5 分鐘，過濾。濾塊經 50 ml 水洗滌 4 次，抽吸瀝乾後，於 80°C 烘箱中減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 7.0 g VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽。

觀察到產率為約 100%。水含量為 0.23%。

VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽之去聚合化反應(製法之步驟 d)):

取 3.67 g (2.3 mmol)VLMWH 置入含 27 ml 無水二氯甲烷之 50ml 三頸燒瓶中。使混合物到 30°C。添加 676 μ l (2.3 mmol)2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,3,2-重氮磷(diazophosphorine)，於 30°C 下攪拌混合物 24 小時。

四級銨鹽形成鈉鹽之轉化法(製法之步驟 e)):

同時另於 250 ml 錐形燒瓶中製備 150 ml 10%乙酸鈉之甲醇溶液。反應混合物倒至甲醇溶液中，同時保持溫度在約 4°C 下。於室溫下攪拌懸浮液約 1 小時。此混合物靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之甲醇(100 ml)。攪拌此混合物 30 分鐘，靜置沉澱 30 分鐘。再度棄置上澄液後，換上等量甲醇(100 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，過濾。濾塊經 40 ml 甲醇洗滌 3 次，抽吸瀝乾後，於 50°C 下減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 966 mg 粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽。

所得產率為 64%。

VLMWH 苯甲基酯鈉鹽之皂化反應(製法之步驟 f)):

取 942 mg (1.43 mmol)去聚合化之 VLMWH 鈉鹽溶於 9.5 ml 水中。溶液置入 100 ml 三頸圓底燒瓶中。於 4°C 之溫度範圍內添加 236 μ l (2.35 mmol)30%氫氧化鈉溶液。於室溫下攪拌混合物

約 2 小時。此溶液經添加冰醋酸(100%)中和。添加 4.5g 乙酸鈉固體與 85 ml 甲醇。攪拌懸浮液約 30 分鐘後，靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液後，換上等量甲醇(40 ml)。攪拌此混合物約 30 分鐘，靜置沉澱約 16 小時。棄置上澄液，然後換上等量甲醇(40 ml)。攪拌此混合物約 30 分鐘，經 0.45 μm 膜過濾。濾塊經 10 ml 甲醇洗滌 2 次，抽吸瀝乾後，於 50°C 下減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 776 mg 粗產物去聚合化之 VLMWH (鈉鹽)。

所得產率為 91.4%。

10 **粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)純化法(製法之步驟 f2))：**

取 758 mg 粗產物去聚合化之 VLMWH (鈉鹽)置入含 7.6 ml 水之 25 ml 三頸燒瓶中。此溶液保持在 40°C 下 10 分鐘。添加 0.1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 至約 9.5。溶液經 0.45 μm 膜過濾，添加 38 μl 30%過氧化氫水溶液。於室溫下攪拌混合物 2 小時，同時
15 添加 0.1N 氫氧化鈉溶液，保持 pH 恆定在 9.5 \pm 0.1。反應混合物經 1N HCl 中和，添加 880 mg NaCl。攪拌約 10 分鐘後，溶液經 0.45 μm 膜過濾。於 4°C 之溫度範圍下添加 6.2 ml 甲醇。於室溫下攪拌溶液約 15 分鐘。添加 16 ml 甲醇。攪拌懸浮液約 1 小時。然後停止攪拌，懸浮液過濾，濾塊經 2 份 15 ml 甲醇洗滌。
20 潮濕之固體抽吸瀝乾後，於 50°C 之溫度範圍內減壓乾燥(6 kPa)。乾燥約 18 小時後，得到 490 mg 純化之去聚合化之 VLMWH (鈉鹽)。

所得產率為 65%。

25 **所得去聚合化之 VLMWH 之特性：**

平均分子量：2000 道爾吞

聚合度分佈性指數：1.1

抗-Xa 活性：205 IU/mg

實例 5：

5 依據本發明之製法製得 VLMWH，其包含之步驟為 96% 酯化反應，及使用第三丁基亞胺基參(二甲基胺基)磷烷之去聚合化步驟。

VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽之去聚合化反應(製法之步驟 d)：

10 取依據實例 4 製得之 3.67 g (2.3 mmol) VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽(96% 酯化)(水含量 0.23%)置入含 30 ml 無水二氯甲烷之 50 ml 三頸燒瓶中。使混合物到 30°C。添加 595 μ l (2.3 mmol) 第三丁基亞胺基參(二甲基胺基)磷烷，於 30°C 下攪拌混合物 24 小時。

15 **四級銨鹽形成鈉鹽之轉化法(製法之步驟 e)：**

同時另於 250 ml 錐形燒瓶中製備 160 ml 10% 乙酸鈉之甲醇溶液。反應混合物倒至甲醇溶液中，同時保持溫度在約 4°C 下。於室溫下攪拌懸浮液約 1 小時。此混合物靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液後，換上等體積之甲醇(120 ml)。攪拌此混合物約 30
20 分鐘，靜置沉澱約 30 分鐘。再度棄置上澄液後，換上等量甲醇(125 ml)。攪拌此混合物約 15 分鐘，過濾。濾塊經 40 ml 甲醇洗滌 3 次，抽吸瀝乾後，於 50°C 之溫度範圍內減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 982 mg 粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽。

所得產率為 65%。

25

粗產物 VLMWH 鈉鹽之皂化反應(製法之步驟 f)：

取 980 mg (1.49 mmol) 粗產物去聚合化之 VLMWH 鈉鹽溶於 10 ml 水中。溶液置入 100 ml 三頸圓底燒瓶中。於 4°C 之溫度範

圍內添加 246 μl (2.45 mmol) 30% 氫氧化鈉溶液。於此溫度下攪拌混合物約 2 小時。此溶液經添加冰醋酸(100%)中和。添加 4.9 g 乙酸鈉固體與 95 ml 甲醇。攪拌懸浮液約 30 分鐘後，靜置沉澱約 1 小時。棄置上澄液後，換上等量甲醇(60 ml)。攪拌此混合物 30 分鐘，靜置沉澱約 16 小時。棄置上澄液，然後換上等量甲醇(60 ml)。攪拌此混合物約 30 分鐘，經 0.45 μm 膜過濾。濾塊經 10 ml 甲醇洗滌 2 次，抽吸瀝乾後，於 50°C 下減壓乾燥(6 kPa)約 18 小時。得到 809 mg 粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)。

所得產率為 91.6%。

10

粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)純化法(製法之步驟 f2))：

取 792 mg 粗產物去聚合化之 VLMWH(鈉鹽)置入含 8 ml 水之 25 ml 三頸燒瓶中。此溶液保持在 40°C 下 10 分鐘。添加 0.1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 至約 9.5。溶液經 0.45 μm 膜過濾，添加 39.6 μl 30% 過氧化氫水溶液。於室溫下攪拌混合物 2 小時，同時添加 0.1N 氫氧化鈉溶液，保持 pH 恆定在 9.5 \pm 0.1。反應混合物經 1N HCl 中和，添加 1.04g NaCl。攪拌約 10 分鐘後，溶液經 0.45 μm 膜過濾。於 4°C 之溫度範圍下添加 7.3 ml 甲醇。於室溫下攪拌溶液 15 分鐘。添加 18.8 ml 甲醇。攪拌懸浮液約 1 小時。然後停止攪拌，混合物過濾，濾塊經 3 份 15 ml 甲醇洗滌。潮濕之固體抽吸瀝乾後，於 50°C 之溫度範圍內減壓乾燥(6 kPa)。乾燥約 18 小時後，得到 538 mg 純化之去聚合化之 VLMWH (鈉鹽)。

所得產率為 67.9%。

15

20

所得去聚合化之 VLMWH 之特性：

平均分子量：2100 道爾吞

聚合度分佈性指數：1.1

抗-Xa 活性：209 IU/mg

實例 6：

製得 VLMWH 之依據本發明方法另包括層析分離雙醣與四醣部
5 份之步驟

取實例 1 說明之寡糖混合物(286 mg)溶於 20 ml 移動相(碳酸
氫鈉水溶液，濃度 0.2 mol/l)中。

層析條件如下：

- 移動相：碳酸氫鈉溶液，濃度 0.2 mol/l
- 10 - 固定相：biogel P6 凝膠
- 管柱：長 1 米，直徑 5 公分
- 檢測波長：240 nm。

收集高於或等於六醣之部份。經乙酸中和後，濃縮至得到含 200
g/l 乙酸鈉之溶液為止。攪拌添加 5 倍體積甲醇至所得溶液中。
15 攪拌懸浮液約 18 小時，經 0.45 μ m 膜過濾。濾塊於 40°C 溫度範
圍內減壓乾燥(6kPa)約 6 小時。所得產物再度沉澱後，溶於最少
量水中，於 Sephadex G10 管柱上脫鹽。脫鹽部份濃縮後，冷凍
乾燥，得到 109 mg 產物。產率 38%。

所得寡糖混合物之特性如下：

20 抗-Xa 活性：403 IU/mg

寡糖百分比如下：

Mw (Da)	聚合度分佈 性	雙醣 %	四醣 %	六醣 %	八醣 %	十醣 %	>十二醣 %
2150	1.0	0	0	53.83	32.58	10.5	3.5

根據本發明化合物之藥理活性；

實例	平均分子量	抗-Xa 活性 IU/mg	抗-IIa 活性
1	1950	283	< .2
2	2100	191	0
3	2000	252	0
4	2000	205	0
5	2100	209	0
6	2150	403	0

根據本發明化合物中六糖 Δ IIa-II_s-Is 之百分比：

實例	六糖部份之百分比	六糖部份中之六糖 Δ IIa-II _s -Is 之 百分比
1	31 %	46 %
2	30 %	26 %
3	33 %	33.5 %
4	32 %	30.8 %
5	31.5 %	28.7 %
6	53.8 %	46 %

五、中文發明摘要：

本發明係有關一種衍生自肝素之寡糖混合物，其平均分子量為 1800 至 2400 道爾吞，其特徵為高 aXa 活性，且沒有 aIIa 活性，並有關其製法與含其之醫藥組成物。

5

10

六、英文發明摘要：

The present invention relates to oligosaccharide mixtures derived from heparin, with an average molecular weight of from 1800 to 2400 daltons, characterized by high aXa activity and an absence of aIIa activity, to a process for preparing them and to pharmaceutical compositions containing them.

15

十、申請專利範圍：

1. 一種寡糖混合物，其具有肝素之多醣組成之一般結構式，且具有下列特性：

- 平均分子量 1800 至 2400 道爾吞，

5 - 抗-Xa 活性為 190 IU/mg 至 450 IU/mg 之間，

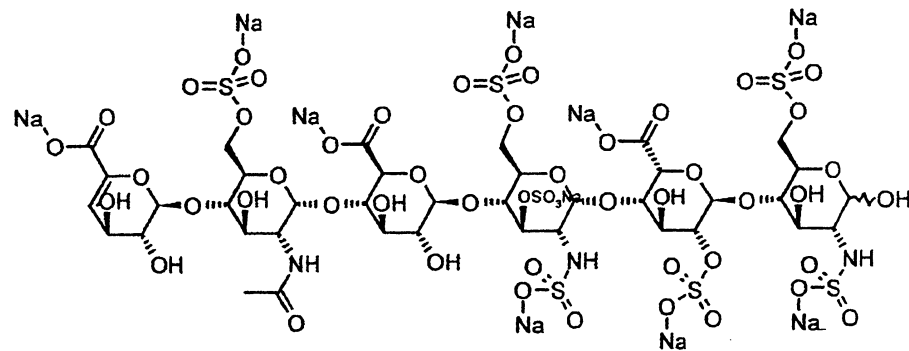
- 沒有(或實質上沒有)抗-IIa 活性，

- 咸了解，該混合物之寡糖組成份

- 包含 2 至 16 個醣單位，

- 其中一末端具有 4,5-不飽和糖醛酸 2-O-硫酸鹽單位，

10 - 且包含如下式之六醣：



Δ Ila

IIs

Is

其係呈鹼金屬或鹼土金屬鹽型。

20 2. 根據申請專利範圍第 1 項之寡糖混合物，其中該鹼金屬或鹼土金屬鹽為鈉、鉀、鈣與鎂鹽類。

3. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之寡糖混合物，其包含 20% 至 100%，特定言之 30% 至 60% 六醣部份。

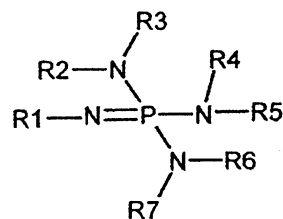
25 4. 根據申請專利範圍第 3 項之寡糖混合物，其中該六醣部份包含 20% 至 70%，特定言之 25% 至 50% 如申請專利範圍第 1 項所定義之六醣 Δ Ila-IIs-Is。

5. 根據申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之寡糖混合物，其平

均分子量在 1900 與 2200，特定言之 1950 至 2150 道爾吞之間。

- 5
6. 根據申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之寡糖混合物，其抗-Xa 活性在 190 IU/mg 至 410 IU/mg 之間，特定言之 200 至 300 IU/mg 之間，且同時沒有(或實質上沒有)抗-IIa 活性。
7. 根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之寡糖混合物，其具有下列特性：
- 平均分子量 1950 至 2150 道爾吞，
 - 抗-Xa 活性在 190 IU/mg 至 410 IU/mg 之間，且沒有(或實質上沒有)抗-IIa 活性，
 - 其包含 30% 至 60% 六糖部份，其中包含 25% 至 55% Δ IIa-II_s-I_s 部份。
- 10
8. 一種製備根據申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項之寡糖混合物之方法，其中由極低分子量肝素(其 aXa 活性高於 140 IU/mg，aIIa 活性低於 5 IU/mg，平均分子量在 2000 至 3000 道爾吞之間)進行下列化學反應：
- 15
- a) 與氯化苄乙氧銨進行轉成鹽反應，得到苄乙氧銨肝素鹽，
 - b) 所得苄乙氧銨肝素鹽與苯甲基氯進行酯化反應，並處理得到極低分子量肝素之苯甲基酯之鈉鹽，
 - c) 所得苯甲基酯進行轉成鹽反應及產生四級銨鹽，
 - d) 利用 pKa 值最好高於 20 之強有機鹼進行去聚合化，以得到去聚合化之極低分子量肝素，
 - e) 轉化去聚合化之極低分子量肝素之四級銨鹽形成鈉鹽，
 - f) 殘留之酯皂化，可視需要純化。
- 20
9. 根據申請專利範圍第 8 項之製法，其中去聚合化步驟 d) 期間所使用強鹼/酯莫耳比例在 0.2 至 5 之間，較佳為 0.6 至 2 之間。
- 25

10. 根據申請專利範圍第 8 或 9 項之製法，其中去聚合化步驟 d) 係使用磷腈衍生物作為鹼進行。
11. 根據申請專利範圍第 8 至 10 項中任一項之製法，其中去聚合化步驟 d) 中，當相對於 VLMWH 苯甲基酯苄乙氧銨鹽使用 1 莫耳當量磷腈鹼進行該方法時，其水含量低於 0.3%。
12. 根據申請專利範圍第 8 至 11 項中任一項之製法，其中去聚合化步驟 d) 期間所使用磷腈鹼家族之鹼類較佳為如下式：



其中基團 R_1 至 R_7 可相同或相異，代表 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基，其中 R_3 與 R_4 若適當時，可與其所附接之 -N-P-N- 基團共同形成 6 員雜環。

13. 根據申請專利範圍第 8 至 12 項中任一項之製法，其中去聚合化步驟期間所使用磷腈家族之鹼為 2-第三丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基全氫-1,3,2-重氮磷(diazaphosphorine)。
14. 根據申請專利範圍第 8 項之製法，其中肝素之苯甲基酯之四級銨鹽於步驟 b) 期間之酯化反應程度在 40% 至 100% 之間，較佳為 70% 至 90% 之間。
15. 根據申請專利範圍第 8 項之製法，其中根據申請專利範圍第 8 項之製法中步驟 b) 所製備之極低分子量肝素之苯甲基酯之四級銨鹽轉化形成鈉鹽之方法係使用乙酸鈉之醇溶液，較佳為 10% 乙酸鈉之甲醇溶液(體重/體積)，於 15 至 25°C 之溫度間處理反應介質。
16. 根據申請專利範圍第 15 項之製法，其中酯化步驟 b) 期間所

添加乙酸钠之重量當量為去聚合化反應中所使用肝素之苯甲基酯之四級銨鹽質量之 3 倍。

- 5
17. 根據申請專利範圍第 8 項製備寡糖混合物之方法，其中步驟 c) 期間所得極低分子量肝素之苯甲基酯之四級銨鹽較佳為苜乙氧銨、鯨蠟基吡啶鎊或鯨蠟基三甲基銨鹽。
18. 根據申請專利範圍第 8 項之製法，其中皂化反應(根據步驟 f) 係使用鹼金屬氫氧化物，如：氫氧化鈉、氫氧化鉀或氫氧化鋰，於水性介質中，於 0 至 20°C 之溫度間，較佳為 0 至 10°C 之間進行。
- 10
19. 根據申請專利範圍第 18 項之製法，其中使用 1 至 5 莫耳當量鹼金屬氫氧化物，更特定言之 1 至 2 莫耳當量鹼金屬氫氧化物。
- 15
20. 根據申請專利範圍第 8 至 19 項中任一項製備根據申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項中對因子 Xa 具有提高選擇性之寡糖混合物之方法，其中亦利用層析法排除雙醣與四醣，特別於填充聚丙烯醯胺瓊脂糖型凝膠之管柱上進行。
- 20
21. 根據申請專利範圍第 8 至 20 項中任一項之製備根據申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項之寡糖混合物之方法，其中使用低分子量肝素作為起始物，或改用抗-Xa 活性在 100 至 140 IU/mg 之間之極低分子量肝素(1500 至 3000 Da) 替代根據申請專利範圍第 8 項所定義之極低分子量肝素。
- 25
22. 根據申請專利範圍第 8 至 20 項中任一項之製備根據申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項之寡糖混合物之方法，其中使用抗-Xa 活性在 100 至 140 IU/mg 之間之極低分子量肝素(1500 至 4000 Da) 作為起始物替代根據申請專利範圍第 8 項所定義之極低分子量肝素。
23. 根據申請專利範圍第 21 項之製法，其中低分子量肝素係選

自：抑帕林(Enoxaparin)、法帕林(Fraxiparin)、法格明(Fragmin)、英諾普(Innohep)(或咯帕林(Logiparin))、諾米弗(Normiflo)、抑普利(Embollex)(或賽帕林(Sandoparin))、弗塞林(Fluxum)(或明達通(Minidaltan))、克發林(Clivarin)與希伯(Hibor)。

5

24. 根據申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項之寡糖混合物，其係依根據申請專利範圍第 7 至 23 項中任一項所定義之製法製得。

10

25. 一種醫學產品，其係使用根據申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項之寡糖混合物。

26. 一種具有抗血栓活性之醫學產品，其係使用根據申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項之寡糖混合物。

15

27. 根據申請專利範圍第 25 或 26 項之醫學產品，其係供治療或預防靜脈與動脈血栓、深部靜脈血栓、肺栓塞、不穩定型心絞痛、心肌梗塞、心臟絕血、周邊動脈之閉鎖性疾與心室纖維顫動、平滑肌細胞增生、動脈粥樣硬化與動脈硬化，藉由調變新血管形成與生長因子來治療與預防癌症，及如：糖尿病性視網膜病變及糖尿病性腎病變之糖尿病病變。

20

28. 一種醫藥組成物，其包含至少一種根據申請專利範圍第 25 項所定義之醫學產品，與一種或多種醫藥惰性賦形劑或媒劑或添加物。

25

29. 根據申請專利範圍第 28 項之醫藥組成物，其包括經皮下或靜脈內注射用之溶液。

30. 根據申請專利範圍第 28 項之醫藥組成物，其包括供吸入用之肺部用調配物。

31. 根據申請專利範圍第 28 項之醫藥組成物，其包括口服用調配物。

32. 一種決定根據申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項寡糖混合物之抗-Xa 活性之方法，其中於產色性受質上採用醯胺分解法，其中再組成緩衝液為聚乙二醇 6000 (PEG 6000)。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

5

10

15

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

20

25