

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101495517 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 10

(21) 申请号 200780028096. 0

代理人 高龙鑫 吴小瑛

(22) 申请日 2007. 05. 24

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C08B 37/10(2006. 01)

60/809, 136 2006. 05. 25 US

A61K 31/727(2006. 01)

60/849, 578 2006. 10. 04 US

60/849, 628 2006. 10. 05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2009. 01. 23

EP 0244236 A2, 1987. 11. 04,

WO 2004/033503 A1, 2004. 04. 22, 说明书

1-44 页.

(86) PCT申请的申请数据

US 2003/0203385 A1, 2003. 10. 30, 说明书

1-35 页.

PCT/US2007/069626 2007. 05. 24

US 5849721 A, 1998. 12. 15,

(87) PCT申请的公布数据

US 6608042 B2, 2003. 08. 19, 说明书 1-14 栏

第 2 段.

WO2007/140231 EN 2007. 12. 06

(73) 专利权人 莫曼塔医药品有限公司

WO 01/02443 A1, 2001. 01. 11,

地址 美国马萨诸塞州

WO 98/55515 A1, 1998. 12. 10,

WO 02/08295 A1, 2002. 01. 31, 说明书 1-18

页.

(72) 发明人 马利克·孙达拉姆

加内什·文卡特拉曼

帕特丽夏·奥利弗 姚一鸣

扎伊纳布·西拉布海·马穆瓦拉

伊恩·菲尔 齐意伟

扎卡里·施赖弗 伊尚·卡皮拉

努尔·西贝尔·居那伊

达妮埃拉·贝卡蒂 刘翠华

科琳娜·鲍尔 李颖

US 6075013 A, 2000. 06. 13, 说明书 1-19 栏
第 3 段.

审查员 许喆

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限

公司 72003

权利要求书 3 页 说明书 65 页 附图 17 页

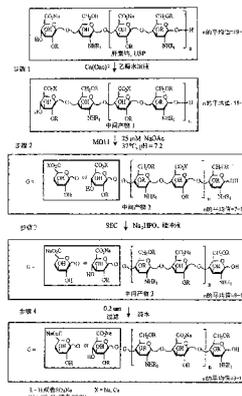
(54) 发明名称

低分子量肝素及其用途

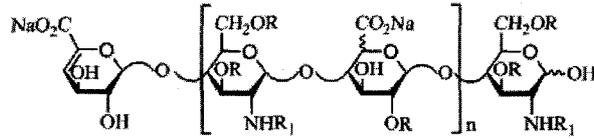
(57) 摘要

本发明提供了具有改进性质(例如提供临床优势的性质的)的低分子量肝素(LMWH)制剂。本发明还提供了制备和使用此类制剂的方法,以及在此类 LMWH 制剂的生产过程中,分析起始原料、加工、中间产物和终产物的方法。

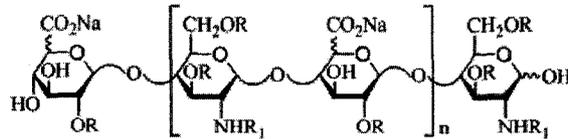
CN 101495517 B



1. 一种低分子量肝素组合物,其包括:
具有以下结构的寡糖链:



和具有以下结构的寡糖链:



其中,

R 是 H 或 SO_3Na ;

R_1 是 SO_3Na 或 COCH_3 ;

$n = 2 \sim 50$; 并且

所述组合物具有以下特征:

- (a) n 的平均值为 $9 \sim 16$,
 - (b) 经测量 $\Delta U_{\text{H}_{\text{Nac}, 6\text{S}} \text{GH}_{\text{NS}, 3\text{S}, 6\text{S}}}$ 为 $5 \sim 15$ 摩尔%。
 - (c) 重均分子量为 $5500 \sim 8500\text{Da}$,
 - (d) 抗 Xa 活性为 $120 \sim 380\text{IU}/\text{mg}$,
 - (e) 抗 Xa 与抗 IIa 的比值为 $2 : 1$ 至 $1 : 1$, 和
 - (f) 所述比值 (e) 在 60 分钟时期内变化不超过 ± 1.5 。
2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物具有 $100 \sim 250\text{IU}/\text{mg}$ 的抗 IIa 活性。
 3. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述组合物的重均分子量为 $5700 \sim 7900\text{Da}$ 。
 4. 如权利要求 3 所述的组合物,其中所述组合物中链总数的 $15\% \sim 35\%$ 在非还原末端具有 $\Delta 4,5$ 未硫酸酯化糖醛酸。
 5. 如权利要求 3 所述的组合物,其中所述组合物中至少 60% 的链在还原末端具有 N-乙酰化己糖胺。
 6. 如权利要求 3 所述的组合物,其中所述组合物中至少 80% 的链在还原末端具有 N-乙酰化己糖胺。
 7. 如权利要求 3 所述的组合物,其具有少于 $1000\text{ng}/\text{mg}$ 的肝素酶;少于 $1\% \text{ w/w}$ 的甲醇;少于 $1\% \text{ w/w}$ 的乙醇;和少于 2000ppm 的游离硫酸盐。
 8. 如权利要求 3 所述的组合物,其中所述抗 Xa 活性为 $170 \sim 330\text{IU}/\text{mg}$ 。
 9. 如权利要求 3 所述的组合物,其中所述抗 IIa 活性为 $130 \sim 190\text{IU}/\text{mg}$ 。
 10. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述组合物中链总数的 $15\% \sim 35\%$ 在非还原末端具有 $\Delta 4,5$ 未硫酸酯化糖醛酸。
 11. 如权利要求 10 所述的组合物,其中所述组合物中至少 60% 的链在还原末端具有 N-乙酰化己糖胺。
 12. 如权利要求 10 所述的组合物,其中所述组合物中至少 80% 的链在还原末端具有 N-乙酰化己糖胺。

13. 如权利要求 10 所述的组合物,其具有少于 1000ng/mg 的肝素酶;少于 1% w/w 的甲醇;少于 1% w/w 的乙醇;和少于 2000ppm 的游离硫酸盐。

14. 如权利要求 10 所述的组合物,其中所述抗 Xa 活性为 170 ~ 330IU/mg。

15. 如权利要求 10 所述的组合物,其中所述抗 IIa 活性为 130 ~ 190IU/mg。

16. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述组合物中至少 60% 的链在还原末端具有 N-乙酰化己糖胺。

17. 如权利要求 16 所述的组合物,其中所述组合物中至少 80% 的链在还原末端具有 N-乙酰化己糖胺。

18. 如权利要求 16 所述的组合物,其具有少于 1000ng/mg 的肝素酶;少于 1% w/w 的甲醇;少于 1% w/w 的乙醇;和少于 2000ppm 的游离硫酸盐。

19. 如权利要求 16 所述的组合物,其中所述抗 Xa 活性为 170 ~ 330IU/mg。

20. 如权利要求 16 所述的组合物,其中所述抗 IIa 活性为 130 ~ 190IU/mg。

21. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述组合物中至少 80% 的链在还原末端具有 N-乙酰化己糖胺。

22. 如权利要求 21 所述的组合物,其具有少于 1000ng/mg 的肝素酶;少于 1% w/w 的甲醇;少于 1% w/w 的乙醇;和少于 2000ppm 的游离硫酸盐。

23. 如权利要求 21 所述的组合物,其中所述抗 Xa 活性为 170 ~ 330IU/mg。

24. 如权利要求 21 所述的组合物,其中所述抗 IIa 活性为 130 ~ 190IU/mg。

25. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其具有少于 1000ng/mg 的肝素酶;少于 1% w/w 的甲醇;少于 1% w/w 的乙醇;和少于 2000ppm 的游离硫酸盐。

26. 如权利要求 25 所述的组合物,其中所述抗 Xa 活性为 170 ~ 330IU/mg。

27. 如权利要求 25 所述的组合物,其中所述抗 IIa 活性为 130 ~ 190IU/mg。

28. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述抗 Xa 活性为 170 ~ 330IU/mg。

29. 如权利要求 28 所述的组合物,其中所述抗 IIa 活性为 130 ~ 190IU/mg。

30. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述抗 IIa 活性为 130 ~ 190IU/mg。

31. 药物组合物,其含有权利要求 1-30 中任一项所述的组合物和药学上可接受的载体。

32. 如权利要求 31 所述的药物组合物,其中所述组合物是冻干的。

33. 如权利要求 31 所述的药物组合物,其中所述组合物是液体。

34. 权利要求 1-30 中任一项所述的组合物或权利要求 31-33 中任一项所述的药物组合物的应用,其用于制备治疗患血栓性疾病或具有患血栓性疾病风险的受试者的药剂。

35. 如权利要求 34 所述的应用,其中所述疾病为急性冠状动脉综合征。

36. 如权利要求 34 所述的应用,其中所述疾病为心肌梗死。

37. 如权利要求 36 所述的应用,其中所述疾病为 ST 段抬高心肌梗死或非 ST 段抬高心肌梗死。

38. 如权利要求 34 所述的应用,其中所述疾病与外科手术的介入相关。

39. 如权利要求 38 所述的应用,其中所述外科手术的介入选自自由血管成形术、经皮冠状动脉介入治疗和支架置入组成的组。

40. 如权利要求 38 所述的应用,其中所述受试者可以是接受了外科手术、具有接受外

科手术的可能或正从外科手术中恢复。

41. 如权利要求 40 所述的应用,其中所述受试者具有接受冠状动脉旁路移植手术的可能。

42. 如权利要求 34 所述的应用,其中所述疾病是稳定型或不稳定型心绞痛。

43. 如权利要求 34 所述的应用,其中可以使用凝血试验监测所述组合物的活性。

44. 如权利要求 43 所述的应用,其中所述凝血试验是活化凝血时间或活化部分凝血活酶时间。

45. 如权利要求 34-44 中任一项所述的应用,其中可以利用硫酸鱼精蛋白中和所述组合物的部分或全部抗 Xa 活性或抗 IIa 活性。

46. 如权利要求 45 所述的应用,其中在冠状动脉旁路移植之前中和所述组合物。

47. 如权利要求 34 所述的应用,其中权利要求 1-30 中的任一项所述的组合物或权利要求 31-33 中的任一项所述的药物组合物被多次浓注,用于维持所需受试者的目标活化部分凝血活酶时间。

48. 如权利要求 45 所述的应用,其中可以在外科手术介入之前、期间或之后中的一个或多个时间监测所述组合物的抗 Xa 活性或抗 IIa 活性。

49. 如权利要求 48 所述的应用,其中所述外科手术介入为冠状动脉旁路移植。

50. 制备权利要求 1-30 中任一项所述的组合物的方法,其包括:

(1) 使用极性有机溶剂、极性非有机溶剂和盐对普通肝素样品进行第一次沉淀以获得第一上清液;

(2) 使用极性有机溶剂和极性非有机溶剂对所述第一上清液进行第二次沉淀以获得沉淀物;

(3) 将所述沉淀物溶解,并使用在未硫酸酯化糖醛酸连接位点切割的酶来切割溶解的沉淀物;

(4) 使用盐和极性有机溶剂沉淀所述经切割的制备物以形成平均链长为 8 ~ 14 个二糖的固体;

(5) 将来自所述固体的物质进行大小筛选以提供平均链长为 9 ~ 16 个二糖的制备物,从而制备所述组合物。

51. 制备权利要求 1-30 中任一项所述的组合物的方法,其包括:

提供平均链长为 8 ~ 14 个二糖的前体组合物;和

加工所述前体组合物以获得平均链长为 9 ~ 16 个二糖的组合物。

52. 制备权利要求 1-30 中任一项所述的组合物的方法,其包括:

(1) 使用极性有机溶剂、极性非有机溶剂和钠盐对普通肝素样品进行第一次沉淀以获得第一上清液;和

(2) 使用极性有机溶剂和极性非有机溶剂对所述第一上清液进行第二次沉淀以获得沉淀物;从而制备组合物。

低分子量肝素及其用途

[0001] 本申请要求于 2006 年 5 月 25 日递交的美国临时申请第 60/809,136 号、于 2006 年 10 月 4 日递交的美国临时申请第 60/849,578 号和于 2006 年 10 月 5 日递交的美国临时申请第 60/849,628 号的优先权,其内容并入本文作为参考。

背景技术

[0002] 凝血是参与维持哺乳动物正常止血的生理途径。在血管受伤的情况下,凝血途径受到激发而形成血液凝块,阻止血液损失。血管受伤发生后,血小板立即开始在受伤部位凝集形成物理堵塞物以阻止血液流失。此外,受伤血管通过血管收缩来减少流经此区域的血流,而血纤维蛋白则开始凝集形成覆盖破裂区域的不溶性网络或凝块。

[0003] 当凝血途径倾向于过量凝结的不平衡状态时,其结果是血栓趋势的形成,通常表现为心脏病发作、中风、深静脉血栓和急性冠状动脉综合征,例如心肌梗死和不稳定型心绞痛。此外,血栓可以引发栓塞,并造成肺栓塞或包括中风或短暂性缺血发作在内的脑血管栓塞。目前与凝血途径中的不平衡相关的病变的治疗方法存在很多风险,必须进行谨慎的控制。

[0004] 肝素和低分子量肝素 (LMWH)、复合物、从内源分离的硫酸酯化多糖是止血的强效调节剂。广泛用作临床抗凝血剂的肝素是由肥大细胞产生的高度硫酸酯化的肝素样葡胺聚糖 (HLGAG),并且是最初的生物聚合物药物之一和少数的糖类药物之一。肝素及其衍生的分子是用于多种临床表现的强效抗凝血剂,特别是用于血栓栓塞性疾病,包括预防和治疗深静脉血栓和肺栓塞、动脉血栓形成和急性冠状动脉综合征(例如心肌梗死和不稳定型心绞痛)。肝素和 LMWH 与凝血级联中的多个组分发生相互作用以抑制血液凝结过程。肝素主要通过两个机制发挥其作用,这两个机制均涉及抗凝血酶 III (AT-III) 与所述聚合物中包含的特异性五糖序列 $H_{NAC/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ 的结合。首先,AT-III 与五糖结合引发蛋白质构象变化,介导所述蛋白质对 Xa 因子的抑制。第二步,凝血酶 (IIa 因子) 也在紧接五糖 / AT-III 结合位点的位置与肝素结合。AT-III、凝血酶和肝素间三元复合物的形成导致凝血酶的失活。与肝素的抗 Xa 活性仅需要 AT-III 五糖结合位点不同,肝素的抗 IIa 活性在需要负责抗 Xa 活性的五糖单元以有效形成 AT-III、凝血酶和肝素间三元复合物之外,还具有位点依赖性。肝素还介导内皮细胞释放组织因子途径抑制物 (TFPI)。肝素辅助因子 TFPI 是直接结合并抑制 X 因子的丝氨酸蛋白酶。TFPI 是一种强效抗血栓形成剂,特别是在与肝素共同施用的情况下。

[0005] 尽管肝素对于多种临床表现都非常有效,并具有用于多个其它方面的潜力,但肝素疗法与多种不同副作用相关。在过去 65 年中,抗凝血是普通肝素 (unfractionated heparin, UFH) 的主要临床应用。由于其不稳定的静脉内药物动力学并缺乏皮下生物利用度,现已将 UFH 以静脉注射施用。此外,UFH 作为抗凝血剂的应用也受到多种副作用的妨碍,这些副作用与结合到 UFH 的非特异性血浆蛋白相关。

[0006] 这导致人们对低分子量肝素 (LMWH) 的产生和利用进行研发以使其作为 UFH 有效替代物。LMWH 提供了更可预见的药理学活性,降低的副作用和比 UFH 更高的生物利用度。

由于商购 LMWH 制剂未经鱼精蛋白完全中和,可能发生具有严重不良作用的意外反应。使用 $\leq 2\text{mg}$ 鱼精蛋白 /100IU 抗 Xa 活性的 LMWH 仅能将依诺肝素 (enoxaparin) 和其它 LMWH 的抗 Xa 活性中和至约 40% 的程度。使用 $\leq 2\text{mg}$ 鱼精蛋白 /100IU 抗 Xa 活性的 LMWH 仅能将抗 IIa 活性中和至约 60% 的程度。(另一方面,使用 $\leq 2\text{mg}$ 硫酸鱼精蛋白 /100IU 抗 Xa 活性的 UFH 可几乎完全中和 ($> 90\%$)UFH 的抗 Xa 和抗 IIa 活性)。

[0007] 这些通常从猪肠粘膜分离的多糖药物制剂在长度和组成方面各不相同。因此,仅有一部分制剂具有抗凝血活性。在最好的情况下,肝素或 LMWH 的药物制剂中的大部分多糖链失活,在最差的情况下,这些链非特异性地与血浆蛋白质相互作用从而产生与肝素疗法相关的副作用。因此,开发保留了 UFH 的抗凝血活性和其它所需活性,但具有较少副作用的新型 LMWH 非常重要。主要由于其链较短和分散性较低,LMWH 显示出显著减少的非特异性血浆蛋白结合性。然而,目前临床使用的所有 LMWH 同样具有低于 UFH 的抗 IIa 活性。因为这一活性的降低,需要较大剂量(与 UFH 相比)的 LMWH 以达到类似的抗 Xa 和抗 IIa 活性,并且用于检测 UFH 活性、活化部分凝血活酶时间(aPTT)或活化凝血时间(ACT)的标准试验也不能使用,因为这些试验主要依赖于抗 IIa 活性以获得读数。最广泛用于监测 LMWH 水平的试验是抗 Xa 活性试验,其依赖于具有足够抗凝血酶 III(ATIII)的样品,而实际情况不总是如此。此试验非常昂贵(远超过 \$100.00),而且因为通常必须将样品送到外面的实验室进行分析,此试验并不是常规试验或易于实施。因此,迄今为止 LMWH 的用途仍主要限制于血栓形成的预防而非治疗,而且可施用 LMWH 的患者群也受到限制:小儿科患者,经 RFI、尿素、肌氨酸、磷、肾小球滤过率(GFR)或血液和尿液 BUN(血尿素氮水平)检测患有肾功能异常的患者以及介入性心脏病患者群均被排除在外。

发明内容

[0008] 本发明部分地基于对具有改进性质的 LMWH 制剂的开发,例如经设计而具有改进性质(例如,提供临床优势的性质)。此类功能性质包括,例如应答硫酸鱼精蛋白的可逆性、可预期的或改进的药物动力学性质、与例如依诺肝素相比改进的抗 IIa 活性;在约 30 ~ 180 分钟的期间内抗 Xa 活性与抗 IIa 活性比值的相对恒定;可检测的活性水平;皮下生物利用度;导致肝素诱导的血小板减少症(HIT)的可能性下降。本文公开的 LMWH 还具有可将其与其它商购 LMWH 区分开的结构特征。例如,本文提供的 LMWH 制剂可具有一种或多种以下性质:基本上不能测得到的连接区域、与可商购的 LMWH 制剂相比增加的 3-0 硫酸酯数量、一些链在非还原末端具有未硫酸酯化的 ΔU 、一些链(例如大部分链或基本上所有的链)在还原末端具有 N-乙酰化己糖胺、 $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$ 与 $\Delta\text{U}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{IH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$ 的比值为约 1 : 1 至 1 : 4(例如,约 1 : 2、2 : 1、3 : 1、4 : 1)以及基本未经修饰的还原末端结构。本发明包括具有以上的一种或多种性质和特征的 LMWH 制剂,以及制备和使用此类制剂的方法。本发明还公开了在生产此类 LMWH 制剂过程中,分析起始原料、加工、中间体和终产物的方法。

[0009] 因此,本发明的第一个方面公开了具有下述特征的 LMWH 组合物:

[0010] 重均分子量为约 5000 ~ 9000Da,例如约 5000 ~ 8300Da,约 5500 ~ 8000Da,约 5700 ~ 7900Da,约 5800 ~ 6800Da;和

[0011] 约 50 ~ 300IU/mg 的抗 IIa 活性,例如约 70 ~ 280IU/mg,约 90 ~ 250 IU/mg,约

100 ~ 250IU/mg, 约 100 ~ 140IU/mg, 150 ~ 200IU/mg, 约 130 ~ 190IU/mg, 约 155 ~ 195IU/mg。

[0012] 本发明的第二方面公开了具有下述特征的 LMWH 组合物：

[0013] 重均分子量为约 5000 ~ 9000Da, 例如约 5000 ~ 8300Da, 约 5000 ~ 8000Da, 约 5500 ~ 8000Da, 约 5700 ~ 7900Da, 约 5800 ~ 6800Da, 和

[0014] 例如通过活化部分凝血活酶时间 (ACT) 或活化部分凝血活酶时间 (aPTT) 测量, 鱼精蛋白中和了至少 50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99% 或 100% 的抗 IIa 活性。优选在施用鱼精蛋白后 5、10、15、30 分钟内, LMWH 的抗 IIa 活性被中和了至少 50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99% 或 100%。

[0015] 本发明的第三方面公开了具有下述特征的 LMWH 组合物：

[0016] 重均分子量为约 5000 ~ 9000Da, 例如约 5000 ~ 8300Da, 约 5500 ~ 8000Da, 约 5700 ~ 7900Da, 约 5800 ~ 6800Da, 和

[0017] 例如通过摩尔%测定, $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 占组合物的 5% 至 15%, 例如 7% 至 14%, 9% 至 12%。优选例如通过摩尔%测定, 位于分子非还原性末端的 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 占组合物的链的约 5% 至 15%, 例如 7% 至 14%, 9% 至 12%。

[0018] 本发明的第四方面公开了具有下述特征的 LMWH 组合物：

[0019] 平均链长为约 9 ~ 18 个二糖或 8 ~ 18 个二糖, 例如约 9 ~ 16 或 8 ~ 16 个二糖；和

[0020] 例如通过摩尔%测定, $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 占组合物的 5% ~ 15%, 例如 7% ~ 14%, 9% ~ 12%。优选例如通过摩尔%测定, 位于分子非还原性末端的 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 占组合物链的约 5% ~ 15%, 例如 7% ~ 14%, 9% ~ 12%。

[0021] 本发明的第五方面公开了具有下述特征的 LMWH 组合物：

[0022] 重均分子量为约 5000 ~ 9000Da, 例如约 5000 ~ 8300Da, 约 5500 ~ 8000Da, 约 5700 ~ 7900Da, 约 5800 ~ 6800Da；和

[0023] 抗 Xa 与抗 IIa 比值为 3 : 1 或更小, 例如 2 : 1、1.6 : 1、1.5 : 1、1.4 : 1、1.3 : 1、1.2 : 1、1.1 : 1、1 : 1 或 0.5 : 1。

[0024] 优选在施用 LMWH 制剂的疗程期间维持相对恒定的抗 Xa 与抗 IIa 比值, 例如在约 30、60、120、180、240、300 分钟的期间内抗 Xa 与抗 IIa 比值的变化不超过约 ± 1.5 、 ± 1 、 ± 0.5 或 ± 0.2 。例如, 如果初始抗 Xa 活性与抗 IIa 活性比值为 2, 则在初始施用后的第二时间 (例如, 在约 30、60、120、180、240、300 分钟) 测量的比值优选小于 3, 并优选等于 2 或在 2 附近。

[0025] 本发明的第七方面公开了具有下述特征的 LMWH 组合物：

[0026] 任选地, 重均分子量为约 5000 ~ 9000Da, 例如约 5000 ~ 8300Da, 例如约 5500 ~ 8000Da, 例如约 5700 ~ 7900Da, 例如约 5800 ~ 6800Da；和

[0027] 在通过使用肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III 消化以及毛细管电泳进行分析时, 存在表 10A 中列出所有峰 1-14。

[0028] 在优选的实施方案中: 根据使用肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III 消化以及毛细管电泳的分析, LMWH 组合物中各个峰值与在表 10A 列出的类似, 各个峰值均在表 10A 提供的范围之内, 峰 10 和峰 11 的值在表 10A 提供的范围之内。

[0029] 本发明的第八方面公开了具有下述特征的 LMWH 组合物：

[0030] 任选地，具有约 5000 ~ 9000Da，例如约 5000 ~ 8300Da、约 5500 ~ 8000Da、约 5700 ~ 7900Da、约 5800 ~ 6800Da 的重均分子量；和

[0031] 通过 2D 核磁共振 (NMR) 分析，存在表 11A 中列出的各结构的质子。

[0032] 在优选的实施方案中：通过 2D NMR 分析，LMWH 组合物中各个结构的量与在表 11A 列出的类似。

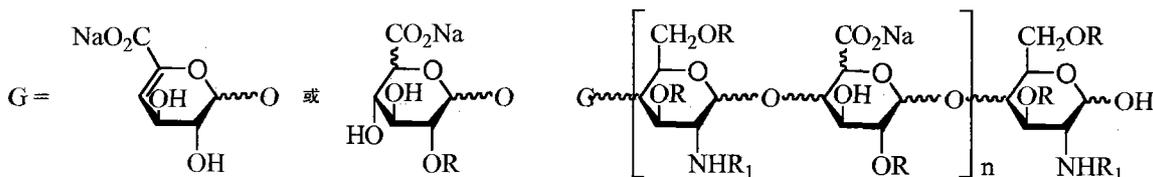
[0033] 本发明的第九方面公开了具有下述一个或多个特征的 LMWH 组合物：

[0034] 所述组合物基本不包含（例如，至少 85%、90%、95% 或更多的链不包含）经修饰的还原末端结构；至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、99% 的组合物链在还原末端具有 H_{NAc} ；组合物 90%、95%、98%、99% 的链在非还原末端均不具有硫酸酯化 ΔU ，优选所述组合物所有链在非还原末端均不具有硫酸酯化 ΔU ；组合物中基本不存在连接区域（例如，小于 0.1% 的连接区域）；所述聚合物中带有 3-O 硫酸酯的链多于可商购的 LMWH（例如，依诺肝素或达肝素）；组合物中 $\Delta U_{H_{\text{NAc}}, 6S} GH_{\text{NS}, 3S, 6S}$ 与 $\Delta U_{2S} H_{\text{NS}, 6S} IH_{\text{NAc}, 6S} GH_{\text{NS}, 3S, 6S}$ 的比值为约 1 : 1 至 4 : 1。

[0035] 在一个实施方案中，所述组合物具有两个、三个、四个、五个或全部以上特征。

[0036] 本发明的第十方面公开了具有以下结构的 LMWH 组合物：

[0037]



[0038] 其中 R 是 H 或 SO_3X ；

[0039] R_1 是 SO_3X 或 COCH_3 ；

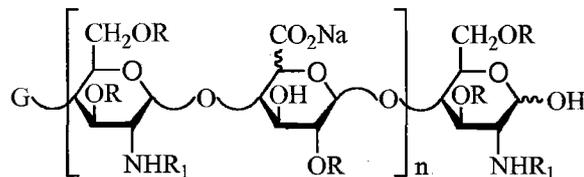
[0040] X 是单价或二价阳离子；

[0041] $n = 2 \sim 50$ ，例如 $2 \sim 40$ ；并且

[0042] 所述组合物的 n 的平均值优选为 $9 \sim 16$ ， $8 \sim 16$ 或 $8 \sim 15$ 。

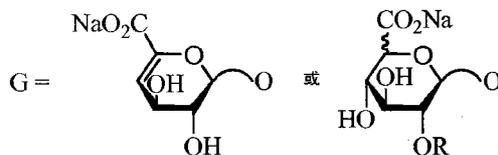
[0043] 在一个实施方案中，所述 LMWH 组合物具有以下结构：

[0044]



[0045] 其中：

[0046]



[0047] R 是 H 或 SO_3X ；

[0048] R_1 是 SO_3X 或 $COCH_3$;

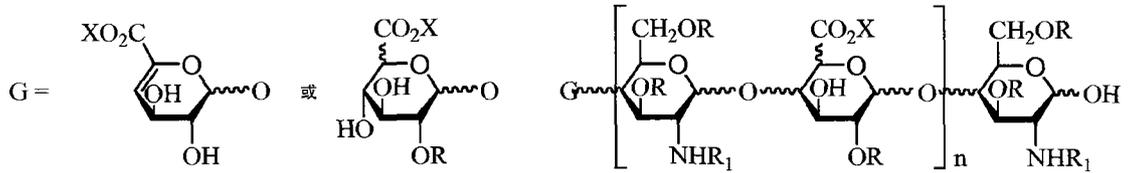
[0049] X 是单价或二价阳离子 ;

[0050] $n = 2 \sim 50$, 例如 $2 \sim 40$; 并且

[0051] 所述组合物的 n 的平均值优选为 $9 \sim 16$, $8 \sim 16$ 或 $8 \sim 15$ 。

[0052] 本发明的第十一方面公开了具有以下结构的 LMWH 组合物 :

[0053]



[0054] 其中 X 是 Na 或 Ca , R 是 H 或 SO_3Na ;

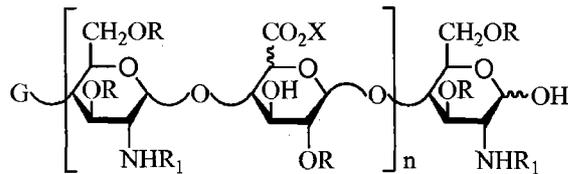
[0055] R_1 是 SO_3Na 或 $COCH_3$;

[0056] $n = 2 \sim 45$, 例如 $2 \sim 35$; 并且

[0057] 所述组合物的 n 的平均值优选为 $7 \sim 11$ 或 $8 \sim 12$ 。

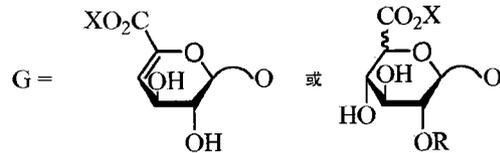
[0058] 在一个实施方案中, 所述 LMWH 组合物具有以下结构 :

[0059]



[0060] 其中 :

[0061]



[0062] X 是 Na 或 Ca , R 是 H 或 SO_3Na ;

[0063] R_1 是 SO_3Na 或 $COCH_3$;

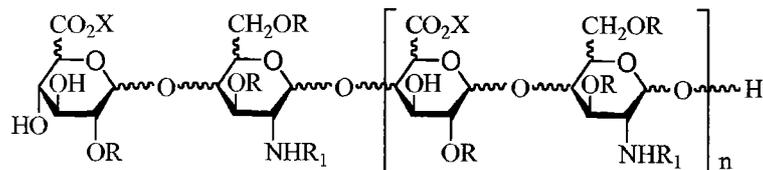
[0064] $n = 2 \sim 45$, 例如 $2 \sim 35$; 并且

[0065] 所述组合物的 n 平均值优选为 $7 \sim 11$ 或 $8 \sim 12$ 。

[0066] 此组合物可作为 LMWH 生产中的中间体存在, 例如作为快速移动组分的酶消化产物 (如本文所述)。

[0067] 本发明的第十二方面公开了具有以下结构的 LMWH 组合物 :

[0068]



[0069] 其中 X 是 Na 或 Ca , R 是 H 或 SO_3Na ;

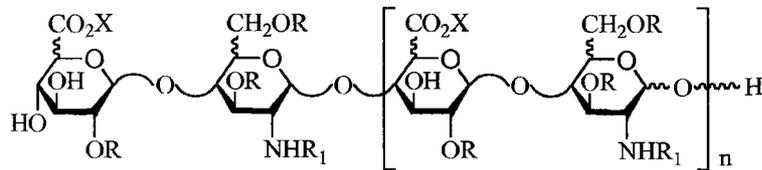
[0070] R_1 是 SO_3Na 或 COCH_3 ;

[0071] $n = 2 \sim 50$, 例如 $2 \sim 40$; 并且

[0072] 所述组合物的 n 的平均值优选为 $8 \sim 15$ (例如 $10 \sim 15$) 或 $9 \sim 16$ (例如 $11 \sim 16$) 。

[0073] 在一个实施方案中, 所述 LMWH 组合物具有以下结构 :

[0074]



[0075] 其中 X 是 Na 或 Ca , R 是 H 或 SO_3Na ;

[0076] R_1 是 SO_3Na 或 COCH_3 ;

[0077] $n = 2 \sim 50$, 例如 $2 \sim 40$; 和

[0078] 所述组合物的 n 的平均值优选为 $8 \sim 15$ (例如 $10 \sim 15$) 或 $9 \sim 16$ (例如 $11 \sim 16$) 。

[0079] 此组合物可作为 LMWH 生产中的中间体 (或称中间产物) 存在, 例如作为快速移动组分的沉淀产物 (如本文所述) 。

[0080] 本文所述的 LMWH (例如上文所述的 LMWH) 可具有其它性质, 例如上述组合物之一可进一步具有一个或多个下文所述的功能或结构性质。

[0081] 因此, 在一个实施方案中, 所述 LMWH 组合物具有的抗 Xa 活性为约 $100 \sim 400 \text{IU/mg}$, 例如约 $120 \sim 380 \text{IU/mg}$, 例如约 $150 \sim 350 \text{IU/mg}$, 例如约 $170 \sim 330 \text{IU/mg}$, 例如约 $180 \sim 300 \text{IU/mg}$, 例如约 $150 \sim 200 \text{IU/mg}$, 约 $200 \sim 300 \text{IU/mg}$, 约 $130 \sim 220 \text{IU/mg}$, 约 $225 \sim 274 \text{IU/mg}$ 。

[0082] 在一个实施方案中, 例如, 经抗 Xa 活性、ACT 或 aPTT 测定, 所述 LMWH 组合物具有的抗 Xa 活性至少 50% 、 60% 、 70% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 99% 、 100% 可被中和。优选在使用鱼精蛋白后 5 、 10 、 15 分钟内, 抗 Xa 活性被中和了至少 50% 、 60% 、 70% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 99% 或 100% 。例如, 在以每 100IU 血浆抗 Xa 活性的 LMWH 组合物施用约 1 、 2 、 3mg 剂量的鱼精蛋白后的 5 、 10 、 15 、 30 分钟之内, 抗 Xa 活性被中和至少 50% 、 60% 、 70% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 99% 或 100% 。

[0083] 在另一个实施方案中, 所述 LMWH 组合物具有一个或多个以下性质: 可通过 aPTT 和 / 或 ACT 监测组合物的活性; 所述组合物的多分散性小于 1.6 , 例如多分散性约为 $1.6 \sim 1.1$, 例如 $1.5 \sim 1.1$, $1.4 \sim 1.1$, $1.3 \sim 1.1$, $1.2 \sim 1.1$; 所述组合物中小于 70% 、 60% 、 50% 、 45% 、 40% 、 35% 、 30% 的链具有大于 7500Da 或 8000Da 的分子量; 所述组合物中小于 40% 、 35% 、 30% 、 25% 的链具有小于 5500Da 或 5000Da 的分子量; 所述组合物在链的非还原末端具有 ΔU 和 I/G 结构的混合; 所述组合物中具有 PF4 结合位点的链少于依诺肝素、达肝素、UFH。

[0084] 在一个实施方案中, LMWH 组合物中约 15% 、 20% 、 25% 、 30% 、 35% 、 45% 、 50% 的链在非还原末端具有 ΔU 。优选所述组合物中约 $15\% \sim 50\%$ 的链 (例如 $15\% \sim 35\%$ 的链, $20\% \sim 35\%$ 的链) 在非还原末端具有 ΔU 。

[0085] 在一个实施方案中,所述 LMWH 组合物具有高于依诺肝素或达肝素的硫酸酯化程度。在一个实施方案中,所述 LMWH 组合物组合物中具有多于依诺肝素或达肝素的三硫酸酯化二糖,例如通过摩尔%测定,所述 LMWH 组合物具有约 50%~65% 的三硫酸酯化二糖,例如 55%~60%、55%~58%、57%~60% 的三硫酸酯化二糖。

[0086] 在一个实施方案中,所述组合物包含的 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 水平高于依诺肝素、达肝素和 / 或 UFH,例如包含约 5~15 摩尔%,7~14 摩尔%,9~12 摩尔%的 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 水平。

[0087] 在一个实施方案中,所述 LMWH 组合物具有小于 3%、2.5%、2%、1.5%、1.0% 的钙含量和 / 或低于 30%、25%、20%、15%、10% 的钠含量。在一个实施方案中,所述 LMWH 组合物具有少于 1000ng/mg、750ng/mg、500ng/mg、250ng/mg 的肝素酶(例如本文所述的肝素酶);少于 1.0%、0.5%、0.3% w/w 的甲醇;少于 1.0%、0.5%、0.3%、0.1% w/w 的乙醇;少于 2.0%、1.75%、1.25%、1.0%、0.5%、0.3%、0.15% 的氯化物;少于 15 重量%、10 重量%、5 重量%、2.5 重量%的水;少于 2000ppm、1500ppm、1000ppm、950ppm、900ppm、850ppm、800ppm、750ppm、700ppm、650ppm、600ppm、550ppm、500ppm、450ppm、400ppm、350ppm、300ppm 的游离硫酸酯。

[0088] 在一个实施方案中,所述 LMWH 组合物提供了大于依诺肝素的 TFPI 释放。在一个实施方案中,与依诺肝素相比,LMWH 提供的 TFPI 释放至少增加了 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40 倍。

[0089] 在一个实施方案中,所述 LMWH 组合物具有约 30 分钟至 3 小时的静脉内半衰期,例如约 1~2 小时。在一个实施方案中,所述 LMWH 组合物具有约 30 分钟至 3.0 小时或 3.5 小时的皮下半衰期,例如约 1.5~2.5 小时(例如约 2 小时)的皮下半衰期。

[0090] 在上述第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十个方面的任意一个实施方案中,所述 LMWH 组合物具有一个或多个下述特征:

[0091] 所述组合物基本不包含(例如,至少 85%、90%、95% 或更多的链不包含)经修饰的还原末端结构;所述组合物至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、99% 的链在还原末端具有 H_{NAC} ;所述组合物 90%、95%、98%、99% 的链在非还原末端均不具有硫酸酯化 ΔU , 优选所述组合物的所有链在非还原末端均不具有硫酸酯化 ΔU ;组合物中基本不存在连接区域(例如,小于 0.1% 的连接区域);所述组合物中带有 3-O 硫酸酯的链多于可商购的 LMWH(例如,依诺肝素或达肝素);组合物中 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 与 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 的比值为约 1:1 至 4:1(例如 1:1,2:1,3:1 或 4:1)。在一个实施方案中,所述 LMWH 组合物具有两个、三个、四个、五个或全部以上特征。

[0092] 另一方面,本发明公开了具有以下性质的 LMWH 组合物:

[0093] 约 5000~9000Da 的重均分子量;

[0094] 约 50~300IU/mg 的抗 IIa 活性;

[0095] 例如通过 ACT 或 aPTT 测定,至少 50% 的抗 IIa 活性可被鱼精蛋白中和;

[0096] $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 占组合物约 5%~15%,优选 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 位于 5%~15% 的组合物非还原末端;

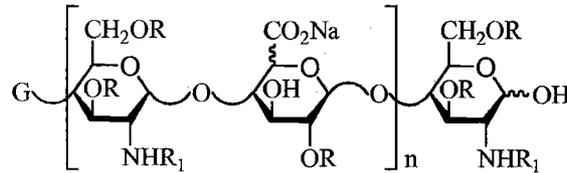
[0097] 约 9~16 个二糖的平均链长;

[0098] 抗 Xa 活性与抗 IIa 活性的比值为 3:1 或以下;

[0099] 在施用 LMWH 的疗程期间维持相对恒定的抗 Xa 与抗 IIa 比值,例如在约 30、60、120、180、240、300 分钟的时间内抗 Xa 与抗 IIa 比值的变化不超过约 ± 1.5 、 ± 1 、 ± 0.5 或 ± 0.2 。例如,如果抗 Xa 与抗 IIa 的初始比值为 2,则在初始施用后第二时间(例如,在约 30、60、120、180、240、300 分钟)测量的比值优选小于 3,并优选等于 2 或在 2 附近。

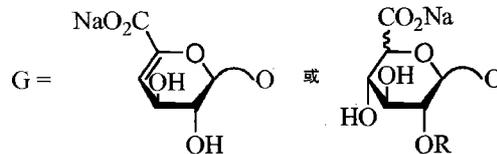
[0100] 在一个优选实施方案中,所述 LMWH 组合物具有以下结构:

[0101]



[0102] 其中:

[0103]



[0104] R 是 H 或 SO_3Na ;

[0105] R_1 是 SO_3Na 或 COCH_3 ;

[0106] $n = 2 \sim 50$, 例如 $2 \sim 40$; 并且

[0107] 所述组合物的 n 的平均值优选为 $9 \sim 16$ 或 $8 \sim 15$ 。

[0108] 在一个优选实施方案中,所述 LMWH 组合物具有一个或多个以下性质:

[0109] 约 $100 \sim 400 \text{IU/mg}$ 的抗 Xa 活性;

[0110] 例如通过 ACT 或 aPTT 检测组合物的抗 Xa 活性,至少 50% 的抗 Xa 活性可被中和;

[0111] 所述组合物的多分散性小于 1.6;

[0112] 所述组合物中小于 70%、60%、50% 的链具有大于 7500Da 的分子量;

[0113] 所述组合物中小于 40% 的链具有小于 5000Da 的分子量;

[0114] 所述组合物在链的非还原末端具有 ΔU 和 I/G 结构的混合;

[0115] 所述组合物基本不具有经修饰的还原末端结构;

[0116] 所述组合物中具有 PF4 结合位点的链少于依诺肝素、达肝素或 UFH;

[0117] 所述组合物中至少 60%、70%、80%、90% 的链在还原末端具有 H_{NAC} ;

[0118] 所述组合物中约 15% \sim 35% 的链在非还原末端具有 ΔU ;

[0119] 所述组合物 90%、95%、98%、99% 的链在非还原末端均不具有硫酸酯化 ΔU , 优选所述组合物的所有链在非还原末端均不具有硫酸酯化 ΔU 。

[0120] 在一个优选实施方案中,所述 LMWH 组合物具有以下性质:

[0121] 具有高于依诺肝素或达肝素的硫酸酯化程度;

[0122] 组合物中三硫酸酯化二糖多于依诺肝素或达肝素,例如通过摩尔%测定,所述 LMWH 组合物具有约 50% \sim 65% 的三硫酸酯化二糖;

[0123] 具有高于依诺肝素、达肝素和 / 或 UFH 的 $\Delta \text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}} \text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$ 水平,例如存在约 5 \sim 15 摩尔%的 $\Delta \text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}} \text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$ 。

- [0124] 在一个优选实施方案中,所述 LMWH 组合物具有以下性质:
- [0125] 具有小于 3% 的钙含量和 / 或低于 20% 的钠含量;
- [0126] 具有少于 1000ng/mg 的肝素酶;
- [0127] 具有少于 1.0% w/w 的甲醇;
- [0128] 具有少于 1.0% w/w 的乙醇;
- [0129] 具有少于 2.0% 的氯化物;
- [0130] 具有少于 15 重量%的水;
- [0131] 具有少于 2000ppm 的游离硫酸酯。
- [0132] 在一个优选实施方案中,所述 LMWH 组合物具有以下性质:
- [0133] 可提供的组织因子途径抑制物 (TFPI) 释放大于依诺肝素。
- [0134] 在一个优选实施方案中,所述 LMWH 组合物具有约 30 分钟至 3 小时的静脉内半衰期。
- [0135] 另一方面,本发明公开了制备 LMWH 的方法。所述方法包括:
- [0136] 使用水性醇 (例如,乙醇) 对 UFH 进行一次或一系列分步沉淀 (至少有一个步骤使用钠盐 (或非钙盐的其它盐)),从普通肝素中提取低分子量组分 (例如,快速移动组分) 以得到第一中间产物,其中所述第一中间产物具有 10 ~ 16 个二糖的平均链长;
- [0137] 在 25 ~ 52°C (例如 37°C) 下,pH 约 5 ~ 9 (例如 pH7 ~ 8) 的缓冲水溶液 (例如,盐水缓冲液、乙酸钠缓冲液) 中,使用切割未硫酸酯化糖醛酸中的糖苷键的试剂 (例如,酶 (例如本发明所述的酶) 或化学试剂),消化所述第一中间产物以产生第二中间产物,其中优选所述第二中间产物具有 8 ~ 14 个二糖 (例如 8-12 个二糖) 的平均链长;
- [0138] 通过基于分子大小的步骤 (例如,体积排阻色谱 (SEC) 的步骤) 从来自较低活性材料的所述第二中间产物中分离高分子量、高抗 Xa 因子和抗 IIa 因子的组分以产生第三中间产物,其中所述第三中间产物具有 9 ~ 16 个二糖的平均链长;并任选地,
- [0139] 将所述第三中间产物溶解在纯化水中,过滤 (例如,通过 0.2µm 滤器),并冷冻干燥成原料药。
- [0140] 另一方面,本发明公开了通过本文所述方法制备的 LMWH 组合物。
- [0141] 另一方面,所述方法包括来自于本文所述 LMWH 组合物的制备或分析方法的中间产物或反应混合物。
- [0142] 另一方面,本发明公开了包括本文所述 LMWH 组合物的药物组合物。
- [0143] 在一个实施方案中,所述药物组合物进一步包括药学上可接受的载体。
- [0144] 在一个实施方案中,所述药物组合物为适合全身给药的剂型。在一个优选实施方案中,所述药物组合物适合于皮下、静脉内、动脉内、滑膜内、肌肉内、腹膜内、玻璃体内、硬膜上、硬膜下或胸腔内给药。在一个实施方案中,用于全身给药的药物组合物可以是等渗溶液,例如带有或不带有防腐剂的等渗溶液。所述防腐剂的实例包括但不限于苯甲醇、甘露醇和亮氨酸。可将单位剂量的本发明药物组合物置于适合施用的包装或装置中,例如可将适合皮下给药的组合物置于用于皮下给药的注射器中,可将适合静脉内给药的组合物置于用于静脉给药的注射器中或置于用于静脉内给药的其它装置中,例如静脉点滴袋或点滴瓶中。
- [0145] 在一个实施方案中,所述药物组合物为适合局部侵入性给药的剂型,例如包被于

适合植入的装置或置于适合植入的装置内。适合植入的装置包括但不限于：支架和体外电路。在一个实施方案中，所述药物组合物是适合于皮下植入、植入到组织或器官（例如，冠状动脉、颈动脉、肾动脉、其它外周动脉、静脉、肾脏、心脏、角膜、玻璃体和大脑），或植入到组织或器官的间隙中（例如，肾囊、心包膜、胸腔或腹膜腔）的剂型。

[0146] 在一个实施方案中，所述药物组合物为适合于非侵入性给药的剂型，例如外用（topical）、透皮、肺部、鼻、口、耳道、直肠或阴道给药。可将单位剂量的本发明药物组合物置于适合此类给药的包装或装置中。

[0147] 在一个实施方案中，所述 LMWH 组合物是冻干的。在另一个实施方案中，所述 LMWH 组合物是液态的。

[0148] 在一个实施方案中，本发明公开了包含所述药物组合物的容器，例如安瓿、注射器或小瓶。在一个实施方案中，所述 LMWH 组合物的存在形式为每 mL 药学上可接受的载体所对应的该组合物的抗 Xa 活性为 1500IU、2000IU、2500IU、3000IU、3500IU、4000IU、4500IU、5000IU、5500IU、6000IU。

[0149] 在一个实施方案中，所述 LMWH 组合物具有约 200 ~ 400mOsm/L，例如约 250 ~ 350mOsm/L，约 280 ~ 330mOsm/L 的渗透度。在一个实施方案中，所述药物组合物进一步包含氯化钠和水。

[0150] 另一个方面，本发明公开了治疗受试者的方法，该方法包括向受试者施用本文公开的 LMWH。所述治疗可以是治疗性的，例如缓解、减轻或改善存在的不良病症或其症状，或是预防性的，例如延迟（例如阻止）不良病症或其症状发生的治疗。本文所述 LMWH 组合物可用于治疗可使用 UFH 或商购 LMWH（例如，依诺肝素、达肝素或亭扎肝素）治疗的病变。本发明包括用于治疗具有病变或病症或具有发生所述病变或病症的风险的受试者的方法，其中所述病变或病症选自于以下组成的组：与凝血相关的病变，例如深静脉血栓（DVT）或肺栓塞；血栓症或心血管疾病，例如急性冠状动脉综合征（ACS）；稳定型或不稳定型心绞痛、心肌梗死，例如 ST 段抬高心肌梗死（STEMI）或非 ST 段抬高心肌梗死（NSTEMI）；血管病症或心房纤颤；偏头痛；动脉硬化症；炎症疾病，例如自身免疫疾病或过敏性疾病、牛皮癣、关节炎、脓血症；弥漫性血管内凝血（DIC）；过敏反应或呼吸系统病变，例如哮喘、肺气肿、成人呼吸窘迫综合征（ARDS）、囊肿性纤维化或肺再灌注损伤；狭窄或再狭窄；癌症或转移性病变；遗传性病变；纤维化病变，例如主要器官纤维化、纤维增生性病变和外伤相关的疤痕；骨质疏松症；阿兹海默症；骨折，例如髌骨骨折。所述受试者可正在进行或已经进行过外科手术，例如器官移植、整形外科手术、关节替换（例如髌关节替换或膝关节替换）、经皮冠状动脉介入治疗（PCI）、支架置入、血管成形术（angioplasty）或冠状动脉旁路移植手术（CABG）。给具有一种或多种所述病变或者具有发生一种或多种所述病变风险的受试者施用有效量的本发明组合物来治疗所述病变或病症。

[0151] 在一个实施方案中，所述方法进一步包括使用凝结试验（例如，使用 ACT 和 / 或 aPTT）监测受试者体内 LMWH 组合物的活性。

[0152] 在一个实施方案中，所述方法进一步包括在施用 LMWH 组合物后施用硫酸鱼精蛋白以中和 LMWH 组合物的部分或全部活性，例如部分或全部抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性。在一个实施方案中，LMWH 组合物的约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或全部抗 IIa 活性被中和，例如，在施用鱼精蛋白后的 5、10、15、20、25、30、40 分钟之内，LMWH 组合物的约 50%、

60%、70%、80%、90%、95%或全部抗 IIa 活性被中和。在一个实施方案中, LMWH 组合物的约 50%、60%、70%、80%、90%、95%或全部抗 IIa 活性被中和, 例如, 在施用鱼精蛋白后的 5、10、15、20、25、30、40 分钟之内, LMWH 组合物的约 50%、60%、70%、80%、90%、95%或全部抗 IIa 活性被中和。在一个实施方案中, 每 100IU 血浆抗 Xa 活性的 LMWH 组合物施用于 1mg、2mg、3mg、5mg 剂量的鱼精蛋白。例如, 可通过 ACT 和 / 或 aPTT 测定对抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性的中和。

[0153] 另一方面, 本发明公开了治疗 (例如, 治疗性或预防性治疗) 受试者所患疾病 (例如血栓性疾病) 的方法。所述方法包括使用本文所述的 LMWH 组合物从而治疗所述疾病, 优选预防所述疾病。在一个实施方案中, 所述疾病是 ACS、心肌梗塞 (例如 NSTEMI 或 STEMI)、稳定型心绞痛和不稳定型心绞痛中的一种或多种。优选, 所述血栓性疾病是动脉血栓症, 例如包括 STEMI。所述疾病可以与外科手术介入相关, 例如 PCI、支架置入或血管成形术。例如, 受试者可经历外科手术, 具有接受外科手术的可能或正处于外科手术康复期, 所述外科手术例如为心血管手术 (例如, 血管成形术、PCI、支架置入)。在一个实施方案中, 受试者具有接受 (例如, 被考虑接受) 外科手术 (例如 CABG) 的可能。

[0154] 在一个实施方案中, 经静脉向受试者施用 LMWH 组合物, 例如以约 0.03mg/kg ~ 0.45mg/kg 的剂量施用, 例如, 0.03mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.22mg/kg、0.25mg/kg、0.27mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.37mg/kg、0.4mg/kg、0.44mg/kg。在优选实施方案中, 以约 0.1 ~ 0.3mg/kg 的剂量经静脉施用 LMWH 组合物, 例如剂量为 0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.20mg/kg、0.22mg/kg、0.25mg/kg、0.27mg/kg 或 0.30mg/kg。在另一个实施方案中, 经皮下向受试者施用 LMWH 组合物, 例如以约 0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.4mg/kg、0.44mg/kg、0.47mg/kg、0.5mg/kg、0.55mg/kg、0.60mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg 的剂量施用。在优选实施方案中, 以约 0.15 ~ 1.0mg/kg、0.20 ~ 0.9mg/kg、0.25 ~ 0.9mg/kg、0.30 ~ 0.50mg/kg 的剂量经皮下施用 LMWH 组合物, 例如剂量为 0.30mg/kg、0.35mg/kg、0.40mg/kg、0.42mg/kg、0.44mg/kg、0.47mg/kg 或 0.50mg/kg。

[0155] 在一个实施方案中, 所述方法进一步包括使用凝结试验 (例如, 使用 ACT 和 / 或 aPTT) 监测受试者体内的 LMWH 组合物的活性。在一个实施方案中, 在外科手术 (例如, 血管成形术、PCI、支架置入) 之前、期间或之后监测抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性, 例如, 通过 ACT 和 / 或 aPTT 进行监测。在一个实施方案中, 在施用 LMWH 组合物之前、期间或之后监测抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性, 例如, 通过 ACT 和 / 或 aPTT 进行监测。在一些实施方案中, 通过 ACT 监测抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性, 并且施用的 LMWH 剂量可达到约 200 ~ 350 秒的 ACT。

[0156] 在一个实施方案中, 所述方法进一步包括在施用 LMWH 组合物后施用 硫酸鱼精蛋白以中和 LMWH 组合物的部分或全部活性, 例如部分或全部抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性。在一个实施方案中, LMWH 组合物的至少约 50%、60%、70%、80%、90%、95%或全部抗 IIa 活性被中和, 例如, 在施用鱼精蛋白后的 5、10、15、20、25、30、40 分钟之内, LMWH 组合物的约 50%、60%、70%、80%、90%、95%或全部抗 IIa 活性被中和。在一个实施方案中, LMWH 组合物的至少约 50%、60%、70%、80%、90%、95%或全部抗 IIa 活性被中和, 例如, 在施用鱼精蛋白后的 5、10、15、20、25、30、40 分钟之内, LMWH 组合物的约 50%、60%、70%、80%、90%、

95%或全部抗 IIa 活性被中和。在一个实施方案中,每 100IU 血浆抗 Xa 活性的 LMWH 组合物施用约 1-5mg 剂量(例如,1mg、2mg、3mg、5mg)的硫酸鱼精蛋白。例如,可通过 ACT 和 / 或 aPTT 测定抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性的中和。在一个实施方案中,可在使用硫酸鱼精蛋白之前、期间和 / 或之后检测抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性,例如通过 ACT 和 / 或 aPTT 进行监测。在一个实施方案中,在外科手术之前、期间或之后中和抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性。例如,在一个实施方案中,可在外科手术(例如血管成形术或 PCI)期间或之后中和抗 Xa 活性和 / 或抗 Ia 活性。在另一个实施方案中,在外科手术(例如 CABG)之前中和 LMWH 组合物。

[0157] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括监测患者的不良反应,例如硬膜上或脊髓血肿、大出血或出血。

[0158] 在一个实施方案中,经静脉或皮下施用所述 LMWH 组合物。

[0159] 在一个实施方案中,将 LMWH 组合物与其它治疗剂组合施用,所述其它治疗剂例如为抗凝血剂或抗血栓形成剂,例如比伐卢定(Angiomax)、ASA、GPIIb/IIIa 抑制剂(例如,埃替非巴肽(eptifibatid)或阿昔单抗)、ADP 抑制剂(例如,Plavix)、rPA、TNKase、阿斯匹林、P2Y₁₂ 抑制剂、血小板抑制剂、华法林及其组合。

[0160] 本文公开的可逆性(可中和)且可监测的 LMWH 组合物可在治疗患者过程中提供改进的适应性,例如对住院并接受心血管治疗(例如手术)可能性评估的患者。因此,本发明另一方面公开了治疗(例如,治疗性或预防性治疗)患者所患疾病(例如血栓性疾病或心血管疾病)的方法。所述方法包括:

[0161] 任选地向患者施用本文所述的可逆性且可监测的 LMWH 组合物;

[0162] 将患者(已施用或将施用 LMWH 组合物)分成不需要外科手术(例如,将患者分成在出院之前不需要外科手术)和很可能在出院前需要接受外科手术(即外科手术介入的候选人)的类别;

[0163] 任选地,如果患者被分到出院前需要接受外科手术介入的候选人类别,则进行监测(例如,使用本文所述的凝结试验,例如 ACT 和 / 或 aPTT)所述可逆且可监测的 LMWH 组合物和 / 或中和(例如,使用本文所述施用的硫酸鱼精蛋白)所述可逆且可监测的 LMWH 组合物。

[0164] 在一个实施方案中,经静脉向受试者施用 LMWH 组合物,例如以约 0.03mg/kg ~ 0.45mg/kg 的剂量施用,例如,0.03mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.22mg/kg、0.25mg/kg、0.27mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.37mg/kg、0.4mg/kg、0.44mg/kg 的剂量施用。在优选实施方案中,以约 0.1 ~ 0.3mg/kg 的剂量经静脉施用 LMWH 组合物,例如,0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.20mg/kg、0.22mg/kg、0.25mg/kg、0.27mg/kg 或 0.30mg/kg 的剂量施用。在另一个实施方案中,经皮下向受试者施用 LMWH 组合物,例如以约 0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.4mg/kg、0.44mg/kg、0.47mg/kg、0.5mg/kg、0.55mg/kg、0.60mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg 的剂量施用。在优选实施方案中,以约 0.15 ~ 1.0mg/kg、0.20 ~ 0.8mg/kg、0.25 ~ 0.90mg/kg、0.30 ~ 0.50mg/kg 的剂量经皮下使用 LMWH 组合物,例如 0.30mg/kg、0.35mg/kg、0.40mg/kg、0.42mg/kg、0.44mg/kg、0.47mg/kg 或 0.50mg/kg 的剂量。

[0165] 在一个优选实施方案中,患者被分到出院前需要接受外科手术介入(例如,PCI、

支架置入或血管成形术)的候选人类别,且对可逆性且可监测的 LMWH 组合物的作用进行监测。在一个优选实施方案中,进行外科手术,并且在手术之前、期间和之后中的一个或多个或所有时间监测可逆性且可监测的 LMWH 组合物。在一个实施方案中,在外科手术(例如,PCI)之前和/或期间监测患者的 ACT 为约 200 ~ 350。

[0166] 在一个优选实施方案中,患者被分到出院前需要接受外科手术介入(例如 CABG)的候选人类别,且对可逆性且可监测的 LMWH 组合物的作用进行监测和/或中和。在一个优选实施方案中,进行外科手术,并且在手术之前、期间和之后中的一个或多个或所有时间监测可逆性且可监测的 LMWH 组合物。在一个实施方案中,在外科手术(例如 CABG)之前监测患者的 ACT 为约 400 ~ 600(例如 400 ~ 500)。

[0167] 在一个优选实施方案中,受试者正在接受对血栓性疾病的治疗。在一个实施方案中,所述疾病是 ACS、心肌梗塞(例如 NSTEMI 或 STEMI)、稳定型心绞痛和不稳定型心绞痛中的一种或多种。优选地,所述血栓性疾病是动脉血栓症,例如包括 ST 段抬高心肌梗死(STEMI)。

[0168] 另一方面,本发明公开了对使用本文所述可监测的 LMWH 组合物治疗的患者进行监测的方法。所述方法包括:

[0169] 任选地向受试者施用本文所述可监测的 LMWH 组合物;和

[0170] 对受试者(已施用可监测的 LMWH 组合物)的 aPTT 和/或 ACT 进行评估。

[0171] 在一个实施方案中,在使用 LMWH 治疗受试者之前测定基线 aPTT 和/或 ACT。在一个实施方案中,所述方法包括对接受 LMWH 的患者的 aPTT 和/或 ACT 与基线 aPTT 和/或 ACT 进行比较。

[0172] 在一个实施方案中,在以下阶段中的一个、多个或全部阶段中监测受试者:接受 LMWH 组合物之前、期间和之后。在一个实施方案中,在外科手术(例如,PCI、支架置入或血管成形术)之前、期间和/或之后监测受试者。在一个实施方案中,在外科手术(例如 PCI)之前和/或期间监测 LMWH 组合物的 ACT 为约 200 ~ 350。在一个实施方案中,在外科手术(例如 CABG)之前监测 LMWH 组合物的 ACT 为约 400 ~ 600(例如 400 ~ 500)。

[0173] 另一方面,本发明公开了对已经施用本文所述可逆性 LMWH 组合物的患者的治疗方法。所述方法包括:

[0174] 任选地向患者施用本文所述的可逆性 LMWH 组合物;和

[0175] 中和(例如,如本文所述(例如施用硫酸鱼精蛋白)可逆性 LMWH 组合物。

[0176] 在一个实施方案中,在以下阶段中的一个、多个或全部阶段中监测受试者:施用硫酸鱼精蛋白之前、期间和之后。

[0177] 另一方面,本发明公开了对具有高抗 IIa 活性的 LMWH(例如,本文所述的 LMWH 组合物)的使用提供建议或使用说明(例如,书面说明、口头说明或计算机生成的说明书)的方法。所述方法包括对患者提供关于使用的说明,例如,具有肾功能异常或糖尿病或与凝血块结合的凝血酶(clot bound thrombin)的患者;接受 PCI、支架置入、CABG、血管成形术等的候选患者;介入性心脏病患者;需要对先前施用的 LMWH 进行中和的患者,例如使用硫酸鱼精蛋白进行中和;具有硬膜上血肿或脊髓血肿、大出血和/或出血风险的患者。在一个实施方案中,所述使用说明适合于 LMWH 组合物针对 ACS、心肌梗塞(例如 NSTEMI 或 STEMI)、稳定型心绞痛和不稳定型心绞痛的施用,例如在患者亚群中的施用,例如患有肾功能异常的

患者或老年患者（例如 60 岁以上的患者）。在一个实施方案中，所述使用说明适合于 LMWH 组合物针对血栓性疾病的施用，例如与外科手术介入（例如，PCI、支架置入或血管成形术）相关的血栓性疾病。

[0178] 另一方面，本发明公开了对本文所述 LMWH 组合物的使用提出建议的方法，该方法包括提供关于使用 ACT 和 / 或 aPTT 监测抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性的说明。

[0179] 另一个方面，本发明公开了生产 LMWH 组合物（例如本文所述的 LMWH 组合物）的方法。所述方法包括以下一个或多个步骤：

[0180] (1) 例如，使用极性有机溶剂（例如，如乙醇的醇类）、极性非有机溶剂（例如水）和盐（例如，如乙酸钠的钠盐或如乙酸钙的钙盐）对包含葡胺聚糖 (GAG) 的样品（例如 UFH）进行第一次沉淀以获得第一上清液；

[0181] (2) 例如，使用极性有机溶剂（例如，如乙醇的醇类）和极性非有机溶剂（例如水）对所述第一上清液进行第二次沉淀以获得沉淀物（可用于提供如本文其它部分讨论的快速移动组分）；

[0182] (3) 将所述沉淀物优选溶于水中并使用切割未硫酸酯化糖醛酸中的糖苷键（例如，与 N-乙酰葡萄糖胺残基相邻的未硫酸酯化糖醛酸中的糖苷键）的试剂切割已溶解的沉淀物。一个实例为本文所述的肝素酶 III，优选 MO11，优选在乙酸钠存在的条件下，且优选完成切割反应（例如，通过 UV 平台表明完成切割反应）以提供经切割的制备物；

[0183] (4) 沉淀经切割的制备物，例如，使用盐（例如钠盐，优选氯化钠）和极性有机溶剂（例如，如甲醇的醇类）以形成含糖类的固体，所述糖类具有 8 ~ 14 个二糖（例如 8 ~ 12 个二糖）的平均链长。

[0184] (5) 将来自所述固体的物质进行纯化，例如色谱纯化（如分子大小筛选（排阻色谱）、离子交换色谱）或过滤，以提供平均分子量高于步骤 (4) 的制品。在一个优选实施方案中，所述平均分子量较高的制品具有 9 ~ 16 个二糖的平均链长或 5000 ~ 9000Da 的平均分子量。

[0185] 另一方面，本发明公开了制备具有约 9 ~ 16 个二糖的平均链长的 LMWH 组合物的方法。所述方法包括：

[0186] 提供平均链长小于 9 ~ 16 个二糖（优选约 8 ~ 14 个二糖，例如 8 ~ 12 个二糖）的 LMWH 组合物前体；和

[0187] 加工所述 LMWH 组合物前体以获得平均链长为约 9 ~ 16 个二糖的 LMWH。

[0188] 优选地，所述加工包括基于大小的筛选，例如依据大小的分离（例如通过一个或多个体积排阻色谱）、离子交换色谱或过滤。

[0189] 在一个实施方案中，所述 LMWH 组合物前体是具有约 8 ~ 14 个二糖（例如，8 ~ 12 个二糖）的平均链长的制剂。在一个优选实施方案中通过包括盐沉淀和对较高分子量制剂（例如 UFH）的酶消化获得所述 LMWH 组合物前体。在一个实施方案中，所述盐是单价或二价阳离子的盐。可使用的所述单价或二价阳离子的实例包括，例如钠、钾、铷、铯、钡、钙、镁、锶及其组合。在一个实施方案中，所述单价或二价阳离子的盐是单价或二价阳离子的乙酸盐。

[0190] 在一个实施方案中，用于消化的一个或多个酶切割未硫酸酯化糖醛酸中的一个或多个糖苷键，例如，与 N-乙酰葡萄糖胺残基临近的未硫酸酯化糖醛酸中的糖苷键。可

使用的酶的实例包括,例如肝素酶 III,肝素酶 III 突变体,例如美国专利第 5,896,789 号所述的肝素酶 III 突变体(例如,将一个或多个组氨酸残基取代为丙氨酸的肝素酶 III 突变体,其中所述组氨酸残基选自于由 His36、His105、His110、His139、His152、His225、His234、His241、His424、His469 和 His539 组成的组),以及来自多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)的肝素硫酸酯葡胺聚糖裂解酶 III。在一个优选实施方案中,用于消化的酶是将氨基酸序列中第 225 位丙氨酸取代成丙氨酸的突变肝素酶 III。

[0191] 在一个优选实施方案中,可通过以下步骤获得组合物前体:

[0192] (1) 对包含葡胺聚糖(GAG)的样品(例如 UFH)进行第一次沉淀以获得第一上清液:例如,使用极性有机溶剂(例如,如乙醇的醇类)、极性非有机溶剂(例如水)和盐(例如,如乙酸钠的钠盐或如乙酸钙的钙盐)对包含葡胺聚糖(GAG)的样品(例如 UFH)进行第一次沉淀以获得第一上清液;

[0193] (2) 对所述第一上清液进行第二次沉淀,例如,使用极性有机溶剂(例如,如乙醇的醇类)和极性非有机溶剂(例如水)对所述第一上清液进行第二次沉淀以获得沉淀物(该沉淀物可用于提供如本文其它部分讨论的快速移动组分);

[0194] (3) 将所述沉淀物溶解并使用肝素酶 III(优选 M011)切割溶解的沉淀物,优选在乙酸钠存在的条件下,且优选完成切割反应(例如,通过大于 9.8 的 UV 吸收表明完成切割),以获得切割后的制备物;

[0195] 本发明的一个方面公开了制备 LMWH 组合物(例如本文所述 LMWH 组合物)的方法。所述方法包括:

[0196] (1) 对包含葡胺聚糖(GAG)的样品(例如 UFH)进行第一次沉淀以获得第一上清液:例如,使用极性有机溶剂(例如,如乙醇的醇类)、极性非有机溶剂(例如水)和盐(例如,如乙酸钠的钠盐或如乙酸钙的钙盐)对包含葡胺聚糖(GAG)的样品(例如 UFH)进行第一次沉淀以获得第一上清液;

[0197] (2) 对所述第一上清液进行第二次沉淀以获得沉淀物:例如,使用极性有机溶剂(例如,如乙醇的醇类)和极性非有机溶剂(例如水)对所述第一上清液进行第二次沉淀以获得沉淀物(可用于提供如本文其它部分讨论的快速移动组分);

[0198] (3) 任选地将所述沉淀物溶解并使用本文所述的酶切割溶解的沉淀物,其中优选在乙酸钠存在的条件下,且优选完成切割反应(例如,通过大于 9.8 的 UV 吸收表明完成切割),以获得切割后的制备物;和

[0199] (4) 任选地加工所得物以产生 LMWH 组合物。

[0200] 在一个实施方案中,用于消化的一个或多个酶切割未硫酸酯化糖醛酸中的一个或多个糖苷键,例如,与 N-乙酰葡糖胺残基临近的未硫酸酯化糖醛酸中的糖苷键。可使用的酶的实例包括,例如肝素酶 III,肝素酶 III 突变体,例如美国专利第 5,896,789 号所述的肝素酶 III 突变体(例如,将一个或多个组氨酸残基取代为丙氨酸的肝素酶 III 突变体,其中所述组氨酸残基选自于由 His36、His105、His110、His139、His152、His225、His234、His241、His424、His469 和 His539 组成的组),以及来自多形拟杆菌的肝素硫酸酯葡胺聚糖裂解酶 III。在一个优选实施方案中,用于消化的酶是将氨基酸序列中第 225 位丙氨酸取代成丙氨酸的突变肝素酶 III。

[0201] 在一个实施方案中,消化后的组分为终产物。在其它实施方案中,所述方法可包括

一个或多个其它加工步骤以获得终产物。在一个实施方案中,所述方法包括加工消化后的组分以获得平均链长为 9 ~ 16 个二糖的 LMWH 组合物。在一个实施方案中,可使用体积排阻色谱、离子交换色谱和 / 或过滤以获得平均链长为 9 ~ 16 个二糖的 LMWH 组合物。

[0202] 另一方面,本发明公开了评价或加工如 UFH 的 GAG 的方法以确定 GAG 是否适合用于加工成 LMWH 组合物,例如本文所述的 LMWH 组合物。所述方法包括测定 GAG 制剂中存在的 N-乙酰基的数量,将测得的数量与预选的标准进行比较,并基于是否满足预选的标准对 GAG 制剂做出判定。在一个优选实施方案中,根据是否满足预选的标准来做出判定或采取步骤,例如将 GAG 制剂分类、接受或放弃、加工成原料药或药物产物或进行记录或修改记录以反映所述判定。在一些实施方案中,如果不能满足预选的标准,可做出改变 LMWH 组合物生产过程中一个或多个步骤的判定。

[0203] 在一个实施方案中,所述的预选标准是如通过摩尔%测定,相对于总葡糖胺含量,GAG 制剂中存在的 N-乙酰基量为约 11% 或更多。可将具有此范围内的 N-乙酰基含量的 GAG 制剂表示为适合于加工成 LMWH 组合物(例如本文所述的 LMWH 组合物)的 GAG 制剂。在此类实施方案中,在满足预选标准的条件下,可接受 GAG 制剂并将其加工成中间产物、原料药或药物产物。

[0204] 在一个实施方案中,可使用例如核磁共振(NMR)测定 GAG 制剂中存在的 N-乙酰基量。

[0205] 在优选的实施方案中,从加工的观点来看,本文公开的方法是有用的,例如监测或保证批次间的一致性或质量,或由预选的标准评估样品。

[0206] 本发明一方面公开了评价或加工 LMWH 中间制剂(例如通过本文所述方法生产的)以确定所述中间制剂是否适合用于加工成 LMWH 组合物。所述 LMWH 中间制剂是通过如本文所述的使用钠盐或乙酸钠在溶剂中沉淀包含葡胺聚糖(GAG)的样品而获得的快速移动组分。所述方法包括将 LMWH 中间制剂中一个或多个结构部分(例如,硫酸酯化艾杜糖、与糖醛酸连接的 N-硫酸酯化己糖胺、环氧化物和 6-O 硫酸酯化己糖胺)的量与普通肝素起始原料中相同结构部分的量进行比较,并基于是否满足起始原料和 LMWH 中间制剂之间的预选标准对中间 LMWH 制剂做出判定。在一个优选实施方案中,根据否满足预选标准来做出判定或采取步骤,例如将中间 LMWH 制剂分类、接受或放弃、加工成原料药或药物产物或进行记录或修改记录以反映所述判定。在一些实施方案中,如果不能满足预选的标准,可做出改变 LMWH 组合物生产过程中一个或多个步骤的判定。

[0207] 在一个实施方案中,所述预选标准是与起始原料相比,中间制剂中的硫酸酯化艾杜糖醛酸减少。可将硫酸酯化艾杜糖醛酸含量减少的中间制剂表示为适合于进一步加工成 LMWH 组合物(例如本文所述的 LMWH 组合物)的中间制剂。在此类实施方案中,在满足预选标准的条件下,可接受中间制剂并将其加工成进一步的中间产物、原料药或药物产物。

[0208] 在一个实施方案中,所述预选标准是与起始原料相比,中间制剂中与糖醛酸(例如,艾杜糖醛酸和 / 或葡萄糖醛酸)连接的 N-硫酸酯化己糖胺增加。可将与糖醛酸连接的 N-硫酸酯化己糖胺含量增加的中间制剂表示为适合于进一步加工成 LMWH 组合物(例如本文所述的 LMWH 组合物)的中间制剂。在此类实施方案中,在满足预选标准的条件下,可接受中间制剂并将其加工成进一步的中间产物、原料药或药物产物。

[0209] 在一个实施方案中,所述预选标准是与起始原料相比,中间制剂中的环氧化物减

少。可将环氧化物含量减少的中间制剂表示为适合于进一步加工成 LMWH 组合物（例如本文所述的 LMWH 组合物）的中间制剂。在此类实施方案中，在满足预选标准的条件下，可接受中间制剂并将其加工成进一步的中 间产物、原料药或药物产物。

[0210] 在一个实施方案中，所述预选标准是与起始原料相比，中间制剂中的 6-O 硫酸酯化己糖胺增加。可将 6-O 硫酸酯化己糖胺含量增加的中间制剂表示为适合于进一步加工成 LMWH 组合物（例如本文所述的 LMWH 组合物）的中间制剂。在此类实施方案中，在满足预选标准的条件下，可接受中间制剂并将其加工成进一步的中 间产物、原料药或药物产物。

[0211] 在一个实施方案中，使用核磁共振 (NMR)、毛细管电泳 (CE) 和高效液相色谱 (HPLC) 中的一个或多个测定起始原料和 / 或中间制剂中的结构部分的量。

[0212] 在优选的实施方案中，从加工的角度来看，本文公开的方法是有用的，例如可用于监测或保证批次间的一致性或质量，或由预选标准评估样品。

[0213] UFH 样品的某些特征可使其成为用于生产本发明 LMWH 的更优选的起始原料。因此，本发明的另一方面提供了评价 UFH 制剂作为生产本文所述 LMWH 组合物的起始原料的方法。

[0214] 所述方法包括根据与 UFH 样品是否适合用于制备本文所述 LMWH 相关的参数对 UFH 制剂提供评价；并且，任选地提供关于测定的参数值（例如，与存在、量、分布或不存在相关的值）是否满足预选标准的判定，例如，存在或存在量在预选范围之内，从而评估 UFH 样品。

[0215] 在一个优选实施方案中，所述标准得到满足，并且选择 UFH 样品并将其加工成 LMWH。

[0216] 在一个优选实施方案中，所述参数为表 2 列出的结构的存在或数量，优选与 LMWH 的生产方法中的步骤的效率相关的结构，例如促进肝素酶切割或正相关于肝素酶切割的结构（例如 $H_{\text{NAc(内在)}}$ ）。

[0217] 在一个优选实施方案中，所述方法包括检测 UFH 样品中 $H_{\text{NAc(内在)}}$ 的量是否具有与参考值的预定关系，例如等于或大于预选的参考值。

[0218] 在一个优选实施方案中，还要对用于生产 LMWH 的中间产物的参数值进行测定，并且任选地，该参数值也必须满足预定标准以选择用于生产 LMWH 的 UFH。

[0219] 本发明的一个方面提供了评价 UFH 制剂作为制备本文所述 LMWH 组合物的起始原料的方法。

[0220] 所述方法包括，任选地操作（例如，沉淀）UFH 样品以提供中间产物（优选用于产生此中间产物的步骤和中间产物与用于生产 LMWH 的方法的步骤和中间产物相同）；根据与中间制剂是否适合用于制备本文所述 LMWH 相关的参数对 UFH 制剂提供评价；和任选地提供关于测定的参数值（例如，与存在、量、分布或缺失相关的值）是否满足预选标准的判定，例如，存在或存在于预选范围之内，从而评估 UFH 制剂。

[0221] 在一个优选实施方案中，所述标准得到满足，并且选择 UFH 样品并将其加工成 LMWH。

[0222] 在一个优选实施方案中，所述参数为表 2 列出的结构的存在或量，优选与生产 LMWH 方法中的步骤的效率相关的参数，例如促进或正相关于肝素酶切割的结构（例如 $H_{\text{NAc(内在)}}$ ）。

[0223] 在一个优选实施方案中，所述方法包括检测中间体样品中 $H_{\text{NAc(内在)}}$ 的量是否具有

与参考值的预定关系,例如等于或大于预选的参考值。

[0224] 在一个优选实施方案中,还要对 UFH 的参数值进行测定,并且任选地,该参数值也必须满足预定标准以选择用于制备 LMWH 的 UFH。

[0225] 在这些方法中的一个方法的优选实施方案中,根据是否满足预选标准而做出判定或采取步骤,例如将样品分类、选择、接受或放弃、释放或保留、加工成药物产物、运输、转移到不同位置、配制、标记、包装、投放到市场中,或销售或许可销售,或进行记录或修改记录以反映所述判定。例如,基于判定结果或是否存在一种或多种受试实体,或基于与参考标准的比较,从而对取样的该批次进行加工,例如,进行本文所述的加工。

[0226] 在任一方法中,优选的实施方案包括使用 NMR 分析样品。

[0227] 在一个优选实施方案中,任一方法可包括提供测定参数值与一个或多个参考值的比较,从而对样品进行评估。在优选的实施方案中,所述比较包括检测试验值是否具有与参考值的预定关系,例如测定其是否满足参考值。所述值不需要为数值,但也可以是仅表明受试实体是否存在的标志。

[0228] 任一方法的优选实施方案可包括测定检测值是否等于或大于参考值,是否小于或等于参考值,或是否处于范围之内(包括或不包括端点中的一个或两个)。

[0229] 在任一方法的优选实施方案中,可保存所述检测值或关于是否满足预选标准的标志,例如保存在计算机可读的记录中。

[0230] 在任一方法的优选实施方案中,通过以下一个、多个或全部步骤制备中间产物:

[0231] (1) 例如,使用极性有机溶剂(例如,如乙醇的醇类)、极性非有机溶剂(例如水)和盐(例如,如乙酸钠的钠盐)对 UFH 样品进行第一次沉淀以获得第一上清液;

[0232] (2) 例如,使用极性有机溶剂(例如,如乙醇的醇类)和极性非有机溶剂(例如水)对所述第一上清液进行第二次沉淀以获得沉淀物(可用于提供如本文其它部分讨论的快速移动组分);

[0233] (3a) 将所述沉淀物溶解,优选溶于水中;

[0234] (3b) 使用切割未硫酸酯化糖醛酸中的糖苷键(例如,与 N-乙酰葡萄糖胺残基临近的未硫酸酯化糖醛酸中的糖苷键)的一个或多个酶(例如肝素酶 III,优选 MO11)切割溶解的沉淀物,优选在乙酸钠存在的条件下,且优选完成切割反应(例如,通过大于 9.8 的 UV 吸收表明完成切割反应),以产生经切割的制备物;

[0235] 尽管所述方法可使用其它中间产物,但优选步骤 (2) 或 (3a) 产生的中间产物。

[0236] 另一方面,本发明提供了评估本文所述 LMWH 制剂的方法。所述方法包括,提供本文所述 LMWH 制剂;测定所述制剂是否存在或具有本文所述的结构、活性或功能,从而评估本文所述 LMWH 制剂。在一个优选实施方案中,所述测定包括测定所述结构、活性或功能是否处于预选水平或在预选范围内,例如本文公开的水平或范围内。

[0237] 因此,本发明的一个方面提供了评估或加工本文所述 LMWH 组合物的方法。所述方法包括提供与表 10A 中列出的峰相关的参数的评估。此类参数可包括峰的存在、相对分布或峰值或是峰的存在、相对分布或峰值的函数,并且任选地确定测定的参数值(例如,与存在、量、分布或缺失相关的值)是否满足预选的标准(例如,存在或存在于预选的范围内),从而评估或加工混合物。

[0238] 在一个优选实施方案中,所述方法包括通过电泳(例如毛细管电泳)对肝素酶 I、

肝素酶 II、肝素酶 III 消化样品的降解物进行分析（例如分离）。

[0239] 在一个优选实施方案中，所述方法包括评价样品以确定是否存在一个或多个表 10A 中列出的峰。

[0240] 在一个优选实施方案中，所述方法可包括提供测定参数值与一个或多个参考值的比较，从而对样品进行评估。在优选的实施方案中，所述比较包括测定检测值是否具有与参考值的预定关系，例如是否满足参考值。所述值不需要为数值，但也可以是仅表明受试实体是否存在的标志。

[0241] 在一个优选实施方案中，所述方法包括测定测定值是否等于或大于参考值，是否小于或等于参考值，或是否处于范围之内（包括或不包括端点中的一个或两个）。举例来说，可测定表 10A 中列出的峰值，并且任选处于预选范围之内的峰值，例如对应于表 10A 中范围的范围。在一个优选实施方案中，各个峰值与在表 10A 列出的类似，各个峰值均在表 10A 提供的范围之内，峰 10 和峰 11 的值在表 10A 提供的范围之内。

[0242] 在优选的实施方案中，可保存所述检测值或关于是否满足预选标准的标志，例如保存在计算机可读的记录中。

[0243] 在优选的实施方案中，根据是否满足预选的标准来做出判定或采取步骤，例如将样品分类、选择、接受或放弃、释放或保留、加工成药物产物、运输、转移到不同位置、配制、标记、包装、投放到市场中，或销售或许诺销售，或记录或修改记录以反映所述判定。例如，基于判定结果或是否存在一种或多种受试实体，或基于与参考标准的比较，从而对取样的该批次进行加工，例如，进行本文所述的加工。

[0244] 可使用 CE 测定表 10A 中的结构，并且在必要时通过其它分析方法进行测定。

[0245] 另一方面，本发明公开了评估或加工本文所述 LMWH 制剂的方法。所述方法包括：

[0246] 提供经肝素酶 I、肝素酶 II、肝素酶 III 消化并经如 CE 的分离技术分离的 LMWH 制剂；

[0247] 检测是否存在表 10A 中列出的一个或多个峰。

[0248] 在一个优选实施方案中，所述方法包括测定表 10A 列出的峰是否在表 10A 中的预选范围之内。在一个优选实施方案中，各个峰值与在表 10A 列出的类似，各个峰值均在表 10A 提供的范围之内，峰 10 和峰 11 的值在表 10A 提供的范围之内。

[0249] 另一方面，本发明提供了评估或加工本文所述 LMWH 组合物的方法。

[0250] 本发明包括提供对与表 11A 中一个或多个结构相关的参数的评估。此类参数可包括峰的存在、相对分布或峰值或是峰的存在、相对分布或峰值的函数，并且任选地确定测定的参数值（例如，与存在、量、分布或缺失相关的值）是否满足预选的标准（例如，存在或存在于预选的范围之内），从而评估或加工混合物。

[0251] 在一个优选实施方案中，所述方法包括使用 2D-NMR 分析所述组合物。

[0252] 在一个优选实施方案中，所述方法包括评估样品以确定是否存在表 11A 中提供的一个或多个结构。

[0253] 在一个优选实施方案中，所述方法包括提供测定参数值与一个或多个参考值的比较，从而对样品进行评估。在优选的实施方案中，所述比较包括测定检测值是否具有与参考值的预定关系，例如测定检测值是否满足参考值。所述值不需要为数值，但也可以是仅表明所述结构是否存在的标志。

[0254] 在一个优选实施方案中,所述方法包括测定检测值是否等于或大于参考值,是否小于或等于参考值,或是否处于范围之内(包括或不包括端点中的一个或两个)。举例来说,可测定表 11A 中列出结构的量,并且任选地处于预选范围内的结构,例如对应于表 11A 中范围的范围。在一个优选实施方案中,各结构的量与在表 11A 列出的类似,各结构的量均在表 11A 提供的范围之内。

[0255] 在优选的实施方案中,可保存所述检测值或关于是否满足预选标准的标志,例如保存在计算机可读的记录中。

[0256] 在优选的实施方案中,根据是否满足预选的标准来做出判定或采取步骤,例如将样品分类、选择、接受或放弃、释放或保留、加工成药物产物、运输、转移到不同位置、配制、标记、包装、投放到市场中,或销售或许诺销售,或记录或修改记录以反映所述判定。例如,基于判定结果或是否存在一种或多种结构,或基于与参考标准的比较,从而对取样的该批次进行加工,例如,进行本文所述的加工。

[0257] 可使用 2D NMR 测定表 11A 中的结构,并且在必要时通过其它分析方法进行测定。

[0258] 另一方面,本发明公开了评估或加工本文所述 LMWH 制剂的方法。所述方法包括提供经 2D NMR 分析的 LMWH 制剂,测定是否存在表 11A 中列出的一种或多种结构。

[0259] 在一个优选实施方案中,所述方法包括测定表 11A 中列出的结构是否位于预选范围之内,例如对应于表 11A 中范围 1 的范围。在一个优选实施方案中,各结构的量与在表 11A 列出的类似,各结构的量均在表 11A 提供的范围之内。

[0260] 本文所述的一些方法包括对受试实体是否以预选水平出现或是否在预选范围内做出判断,并且将所述水平或范围表示为特定测量单位,例如,摩尔%,例如以 X-Y 摩尔%的范围存在。任何人均可实施以摩尔%为单位测定受试实体的量的方法,并随后将测定量与表示为摩尔%(在此实例中为 X-Y 摩尔%)的参考进行比较。然而,以摩尔%为单位进行的测定并不一定与也以摩尔%表示的参考值进行比较。在以摩尔%的单位表示时,所述样品具有的受试实体的实际水平可被表示为 X-Y。也可使用其它单位,例如使用重量%表示所述实际水平。不管用什么单位表示,所述实际水平都是相同的。本方法中摩尔%的说法仅用来表明受试实体的实际含量。只要以其它单位表示的参考值与以摩尔%(在此实例中为 X-Y 摩尔%)表示的参考值对应于相同的受试实体量,就可使用其它单位测量受试实体的水平并且以其它单位表示参考值。因此,要求以 X-Y 摩尔%表示受试实体的存在量的方法可通过用其它测量单位(例如,重量%、链的数量或%AUC)表示该受试实体的存在范围,其中,用其它测量单位表示的范围对应于以摩尔%(在此实例中为 X-Y 摩尔%)给出的相同量的受试实体。

[0261] 可结合本说明书实施本领域已知方法建立其它测量单位的函数等价范围。例如,可提供在 X-Y 摩尔%范围内的样品,并随后建立这些样品的以其它测量单位表示的对应范围。

[0262] 本发明的其它特征和优点可体现于以下具体实施方案和权利要求书中。

附图说明

[0263] 首先简要描述附图。

[0264] 图 1:描述 M118-REH 生产过程四个步骤的流程图。

[0265] 图 2A :描述经肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III 消化的依诺肝素的毛细管电泳图谱。图 2B :描述经肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III 消化的 M118-REH 的毛细管电泳图谱。

[0266] 图 3 :描述对经离子对 RP HPLC 分析的 M118-REH 降解物进行柱后标记后产生的 UV 图谱和荧光图谱的比较。上侧迹线表示 232nm 下的 UV 检测,下侧迹线表示 410nm 下的荧光检测。箭头标记的位置显示主要存在于荧光图谱中但未在 UV 图谱中观察到的物质;他们表示 M118-REH 中来自起始 UFH 的非还原性末端糖。

[0267] 图 4 :描述 M118-REH 的二维 NMR HSQC 分析图。

[0268] 图 5 :描述还原性和非还原性末端形成的示意图。

[0269] 图 6 :可注射 M118-REH 的生产流程图。

[0270] 图 7 :描述通过硫酸鱼精蛋白在体外中和 LMWH 的示意图。较浅点表示“M118”(M118-REH 在此图中的简称);较深点表示依诺肝素钠。图 7 由剩余抗 Xa 活性百分比对鱼精蛋白 /LMWH 活性比值绘制。

[0271] 图 8 :描述使用 0.01mg/ml 的不同肝素后人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 释放 TFPI 的示意图(孔的数量 $n = 3$,平均值 \pm STDEM)。在温育 24 和 48 小时后,M118(M118-REH 在此图中的简称)(各组中从左起的第二个)与对照(各组中从左起的第一个)和对照组之间存在统计显著性 ($p < 0.01$)。

[0272] 图 9 :描述向 NHP 模型静脉注射 M118-REH 后,通过 ACT 和 aPTT 测定的所述 M118-REH 药效学的示意图。

[0273] 图 10 :描述向氯化铁诱发的血栓症模型静脉注射 0.5mg/kg(第三个)和 1mg/kg(第六个)M118-REH,2mg/kg、3mg/kg 和 4mg/kg(分别为第二、第四和第五个)依诺肝素钠后,TT0 的比较示意图。与对照(第一个)相比,所有的处理组均具有显著延长的 TT0。M118-REH(1mg/kg) 和依诺肝素钠 (3mg/kg) 之间存在统计显著性 ($p < 0.01$)。

[0274] 图 11 :描述通过硫酸鱼精蛋白中和 Sprague-Dawley 大鼠模型中肝素 (M118-REH、依诺肝素钠和 UFH) 的抗 Xa 活性的示意图。图 11 是剩余抗 Xa 活性百分比与时间的曲线图,比例为 0.5mg 或 1mg 鱼精蛋白 /100IU 抗 Xa 活性肝素(在 UFH 中为 0.5mg 或 1mg 鱼精蛋白 :1mg UFH)。

[0275] 图 12 :描述 ACT 测定与 M118-REH(三角和实线)、依诺肝素(实心圆和虚线)和 UFH(方块和虚线)的抗 Xa 活性之间相关性的示意图。此数据表明与依诺肝素或 UFH 相比,特定剂量的 M118-REH 表现出 ACT 与抗 Xa 活性之间的最佳相关性 ($r^2 = 0.85$)。

[0276] 图 13 :犬深动脉血栓模型 (Lucchesi 模型) 中抗 Xa 因子活性(上图)和抗 IIa 因子活性(下图)与时间关系的示意图。图中显示的溶剂对照组随后接受 150IU/kg 的 M118-REH。误差范围是 \pm SE。UFH,普通肝素。

[0277] 图 14 :犬深动脉血栓模型 (Lucchesi 模型) 中抗 Xa 因子活性与抗 IIa 因子活性之间的相关性。各个点代表来自单个动物的数据。显示了所有处理组的全部动物。M118-REH 和普通肝素 (UFH) 组的相关系数 (r^2) 分别为 0.890 和 0.465。

[0278] 图 15 :犬深动脉血栓模型中抗 Xa 因子活性 / 抗 IIa 因子活性比值随时间的变化。误差范围是 \pm SE(考虑附图清晰度仅显示上限)。UFH,普通肝素。

[0279] 图 16 :犬深动脉血栓模型中经 ACT(上图)、aPTT(中图)和 PT(下图)测定的凝结活性与时间关系的示意图。图中显示的溶剂对照组随后接受 150IU/kg 的 M118-REH。误

差范围是 \pm SE。UFH, 普通肝素。

[0280] 图 17: 发生股动脉闭塞的动物占犬深动脉血栓模型的百分数。通过多普勒血流仪在试验开始后 180 分钟的时间段内对动物进行监测。闭塞定义为流过损伤动脉的血流量低于基线血流的 2%。UFH, 普通肝素。

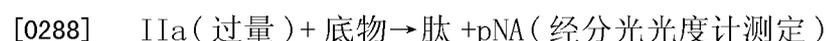
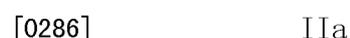
具体实施方式

[0281] 优化的 LMWH

[0282] 在很多临床条件下, 因为 LMWH 具有更可预知的药物动力学参数并且可经皮下给药, 所以商购 LMWH 制剂优于 UFH 制剂。然而, 目前可用的 LMWH 制剂缺少 UFH 所具有的很多有用性质, 例如较高的抗 IIa 活性、使用硫酸鱼精蛋白的可逆性 (可中和性) 和可监测性。因此, 在某些临床条件下, LMWH 不是最优或实际的治疗选择。本发明公开了经设计其临床性质优于其它商购 LMWH 制剂和 UFH 制剂的 LMWH 制剂。所述临床性质包括, 例如使用硫酸鱼精蛋白的可逆性、可预知的药物动力学参数、抗 IIa 活性、基本恒定的抗 Xa 活性与抗 IIa 活性的比值、可通过标准试验 (例如, ACT 或 aPTT) 进行监测的活性水平、皮下生物利用度和降低的 HIT 发生率。

[0283] 抗 IIa 活性

[0284] 本文公开的 LMWH 制剂包含大量足够长的链 (可表述为, 例如制剂的平均链长和 / 或制剂的重均分子量) 以提供抗 IIa 活性, 例如约 50 ~ 300IU/mg, 约 70 ~ 280IU/mg, 约 90 ~ 250IU/mg, 约 100 ~ 140IU/mg, 约 100 ~ 140IU/mg, 约 150 ~ 约 200IU/mg, 约 130 ~ 190IU/mg, 约 155 ~ 195IU/mg 的抗 IIa 活性。使用平行试验的统计方法计算每毫克的抗 IIa 活性 (以国际单位计)。使用以下原理测定本文所述的抗 IIa 活性水平。



[0289] 通过样品对抗凝血酶 (ATIII) 凝血酶抑制的增效作用来测定抗 IIa 因子的活性。可间接通过分光光度计测量过量的凝血酶。可使用 Chromogenix (S-2238 底物, 凝血酶 (53kat/瓶) 和抗凝血酶) 在 Diagnostica Stago 分析仪或 ACL Futura™ 凝血系统上, 或在任意等价系统上测定抗 IIa 因子活性。使用第二国际低分子量肝素标准 (2nd International Standard for Low Molecular Weight Heparin) 校正分析仪的结果。

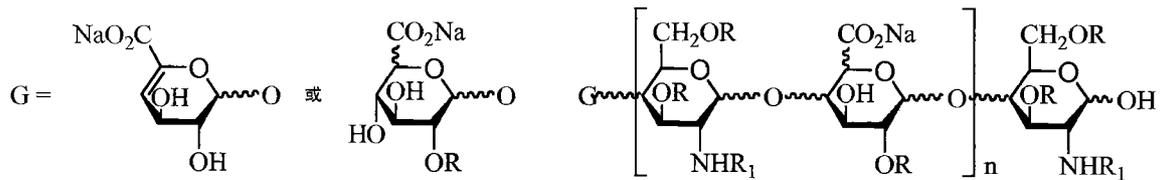
[0290] 链长度 / 分子量

[0291] 例如, 可通过测定 LMWH 制剂中链的平均链长度和 / 或测定 LMWH 制剂中链的重均分子量确认 LMWH 制剂是否包含足够长的链。测定平均链长时, 约 5 ~ 20 (例如 7 ~ 18) 的平均链长度, 优选约 9 ~ 16 或 8 ~ 14 个二糖重复, 表明 LMWH 制剂中有大量足够长的链。

[0292] 本文所用“平均链长度”是指链中出现的糖醛酸 / 己糖胺二糖重复的平均链长。存在的非糖醛酸和 / 或非己糖胺二糖构建单元 (例如, 相连的 PEG 部分) 不包含在平均链长的测定中。由数均分子量 (Mn) 除以二糖的数均分子量 (500 Da) 来测定平均链长度。下文描述了使用 SEC MALS 测定数均分子量的方法。

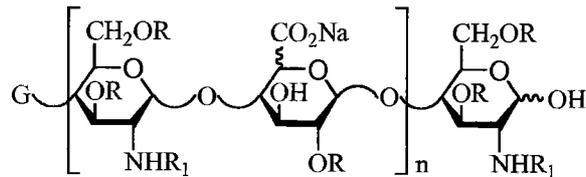
[0293] 此类 LMWH 制剂的实例包括下文所述:

[0294]

[0295] 其中 R 是 H 或 SO_3X ;[0296] R_1 是 SO_3X 或 COCH_3 ; 和 X 是单价或二价阳离子 (例如 Na 或 Ca) ;

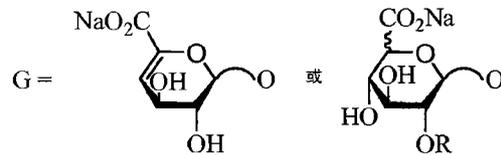
[0297] 并且平均 n 为 9 ~ 16 或 8 ~ 15。

[0298]



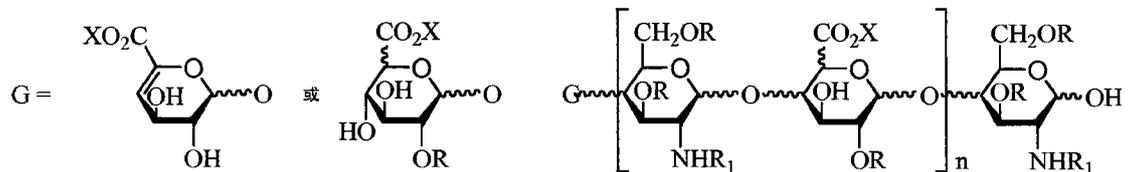
[0299] 其中 :

[0300]

[0301] R 是 H 或 SO_3X ;[0302] R_1 是 SO_3X 或 COCH_3 ; X 是单价或二价阳离子 (例如 Na 或 Ca) ;

[0303] 并且平均 n 为 9 ~ 16 或 8 ~ 15。

[0304]



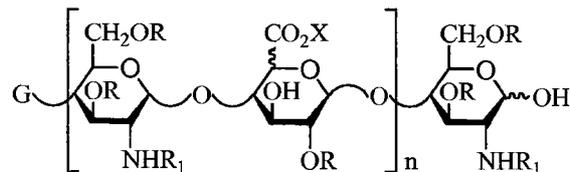
[0305] 其中,

[0306] X 是单价或二价阳离子 (例如 Na 或 Ca) ;

[0307] R 是 H 或 SO_3X ;[0308] R_1 是 SO_3X 或 COCH_3 ; 并且

[0309] n 平均约为 8 ~ 12 或 7 ~ 11 ; 和

[0310]



[0311] 其中,

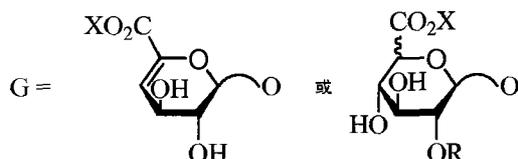
[0312] X 是单价或二价阳离子 (例如 Na 或 Ca) ;

[0313] R 是 H 或 SO_3X ;

[0314] R_1 是 SO_3X 或 $COCH_3$;

[0315] n 平均约为 8 ~ 12 或 7 ~ 11, 并且

[0316]



[0317] 测定制剂的重均分子量时, 约 5000 ~ 9000Da, 约 5000 ~ 8300Da, 优选约 5500 ~ 8000Da, 约 5700 ~ 7900, 或约 5800 ~ 6800Da 的重均分子量说明 LMWH 组合中有大量链具有足够的链长。

[0318] 本文所用“重均分子量”是指糖醛酸 / 己糖胺二糖重复链的平均重量 (以道尔顿计)。存在的非糖醛酸和 / 或非己糖胺的构建单元不被包括在重均分子量的测定中。因此, 制剂的一个或多个链中非糖醛酸和非己糖胺构建单元的分子量不包含在对重均分子量的测定中。根据等式: $M_w = \sum (c_i m_i) / \sum c_i$ 计算重均分子量 (M_w)。变量 c_i 是片段 i (slice i) 聚合物的浓度, m_i 是片段 i 聚合物的分子量。对色谱峰求和, 该色谱峰包含多个片段的数据。在色谱峰与时间的坐标图中, 一个片段的数据可表示为一条垂直直线。因此, 可以将洗脱峰分成多个片段。重均分子量的计算依据所有片段的浓度和分子量的总和进行平均。例如, 可使用 Wyatt Astra 软件或任意适合的软件计算重均摩尔质量。使用串联的两个柱子 (例如, TSK G3000 SWXL 和 G2000 SWXL) 以及与之偶联的多角度光散射 (MALS) 检测器和折射检测器通过高效液相色谱测定本文所述重均分子量。所用的洗脱液是 0.2 硫酸钠, pH5.0, 流速为 0.5 mL / 分钟。

[0319] 非还原末端结构

[0320] 除了链长度, 制剂中约 5 ~ 15 摩尔%、7 ~ 14 摩尔% 或 9 ~ 12 摩尔% 的链还可在距离链非还原末端的约 2 个、4 个或 6 个单糖的位点处或之内具有 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 。可用于定量此类结构的方法包括: 例如, 毛细管电泳 (CE) 和如反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 的高效液相色谱 (HPLC)。可测定 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 的反应因子 (RF) 以定量 LMWH 制剂中 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 的摩尔%。所述测定还可包括测定获得的所有物质的 RF, 例如使用 CE 或 HPLC, 例如本文所述的 CE 方法。为了通过 CE (例如本文所述的 CE 方法) 获取一种或所有物质的 RF, 可将一种或多种物质的已知浓度的标准物注射到 CE 中, 并用以测定各物质的 RF。随后, 可使用 RF 确定摩尔%。如本文所述, 样品具有的结构实际水平可被表示为, 例如以摩尔% 的单位计, 5 ~ 15 摩尔%。所述实际水平也可由其它单位表示, 例如重量%。不管用什么单位表示, 所述实际水平都是相同的。本方法中摩尔% 的说法仅用来表明受试实体的实际存在量。只要以其它单位表示的参考值与以摩尔% (在此实例中为 5 ~ 15 摩尔%) 表示的参考值对应于相同的受试实体量, 可使用其它单位测量受试实体的水平并且以其它单位表示参考值。因此, 要求以 5 ~ 15 摩尔% 表示所述结构的存在水平的方法可通过用其它测量单位 (例如, 重量%、链的数量或 % AUC) 表示该结构存在于以该单位表示的一个范围内, 其中, 如关于其它测量单位的描述, 所述范围与以摩尔% (在此实例中为 5 ~ 15 摩尔%) 给出的同一受试实体的量相同。

[0321] 本文所述 LMWH 制剂可在制剂中链的非还原末端具有 ΔU 和艾杜糖醛酸 (I) / 葡萄糖醛酸 (G) 的混合。术语“ ΔU ”是指由肝素酶、HSGAG 裂解酶或具有类似底物特异性的其

它酶的裂解活动导致在 4-5 位点具有引入双键的不饱和糖醛酸（艾杜糖醛酸 (I)、葡萄糖醛酸 (G) 或半乳糖醛酸）。优选地，制剂中链总量的约 15%~35%，20~30%（例如，15%、20%、25%、30%、35%）在链的非还原末端具有 ΔU 。可使用例如 2D-NMR 测定样品中链非还原末端 ΔU 和 / 或 I/G 的数量。在此方法中，可使用在还原末端具有乙酰化己糖胺 (H_{NAc}) 链的总数和 / 或还原末端开环构象数目来确定制剂中链的总数。可将制剂中在非还原末端具有 ΔU 和 / 或 I/G 的链的总百分数与链的总数进行比较。优选地，如本文所述的制剂中，90%、95%、98%、99% 的链在非还原末端均不具有硫酸酯化 ΔU ，优选所述制剂中所有链在非还原末端均不具有硫酸酯化 ΔU 。

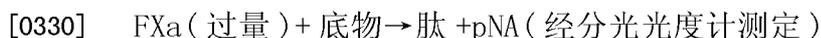
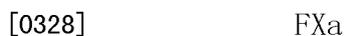
[0322] 还原末端结构

[0323] 在一些实例中，本文提供的 LMWH 制剂基本不带有经修饰的还原末端。在优选的实施方案中，LMWH 制剂中至少 85%、90%、95%、98%、99% 或所有的链均具有非修饰的还原末端结构。

[0324] 所述“经修饰的还原末端”是指由天然源分离或制备所述制剂时在制剂中链的还原末端形成的结构。例如很多商购 LMWH 制剂主要由普通肝素通过化学或酶促的多糖链解聚作用衍生而来。用于制备 LMWH 的过程可在来自天然源的起始原料的多糖链还原末端造成一个或多个独特的结构修饰。例如，肝素的亚硝酸解聚作用导致还原末端 2,5-脱水甘露糖的形成，该 2,5-脱水甘露糖可被还原以形成醇，而通过糖醛酸上羧酸酯官能团的酯化进行解聚并随后进行 β -消除可导致一些链的还原末端上形成 1,6-脱水结构 (1,6-anhydro)。因此，2,5-脱水甘露糖和 1,6-脱水结构是发现于 LMWH 中一些链上的经修饰还原末端结构的实例。本文提供的 LMWH 制剂中的链可包括，例如至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 的链或所有的链均在还原末端具有乙酰化己糖胺。

[0325] 抗 Xa 活性

[0326] LMWH 制剂的抗 Xa 活性在 LMWH 制剂的生物活性中起作用。优选地，本文提供的 LMWH 制剂具有约 100~400IU/mg，例如约 120~380IU/mg，例如约 150~350IU/mg，例如约 170~330IU/mg，例如约 180~300IU/mg，例如约 150~200IU/mg，200~300IU/mg 的抗 Xa 活性。使用平行试验的统计方法计算每毫克 LMWH 制剂的抗 Xa 活性（以国际单位计）。使用以下原理测定本文所述 LMWH 制剂的抗 Xa 因子活性。



[0331] 通过样品对抗凝血酶 (ATIII) 活化 Xa 因子 (FXa) 抑制的增效作用来测定抗 Xa 因子活性。可间接通过分光光度计测量过量的 Xa 因子。可使用 **Stachrom**[®] 肝素测试试剂盒在 Diagnostica Stago 分析仪，或使用 Chromogenix 的 **Coatest**[®] 肝素试剂盒在 ACL Futura[™] 凝血系统上，或在任意等价系统上测定抗 Xa 因子活性。使用低分子量肝素的 NIBSC 国际标准校正分析仪的响应。

[0332] 抗 Xa/IIa 比值

[0333] 在一些方面，本文提供的 LMWH 制剂具有 3 : 1 或更小的抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性的比值，例如 2 : 1、1.6 : 1、1.5 : 1、1.4 : 1、1.3 : 1、1.2 : 1、1.1 : 1、1 : 1。上文

已经描述了用于测定抗 Xa 因子活性和抗 IIa 因子活性的方法。由抗 Xa 因子活性（折干计算）除以抗 IIa 因子活性（折干计算）来计算抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性的比值。

[0334] 肝素和 LMWH 制剂的抗 Xa 活性和抗 IIa 活性均与抗凝血酶 III (ATIII) 与制剂链中存在的表示为 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 的特异序列的结合相关。ATIII 与此序列的结合介导了抗 Xa 活性。此外，凝血酶 (IIa 因子) 也在接近于 ATIII 结合位点的位置与肝素结合。与抗 Xa 活性仅需要 AT-III 结合位点不同，抗 IIa 活性需要 ATIII 结合位点以及距离 ATIII 结合位点末端足够长的链。本文提供的 LMWH 制剂的抗 II 活性至少部分由于 LMWH 制剂中链非还原末端或非还原末端附近存在的 $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ 以及制剂中存在的多数链的长度。这个组合可产生制剂中对抗 Xa 活性和抗 IIa 活性均有贡献的链。如果同一条或多条链可提供抗 Xa 活性和抗 IIa 活性，除去所述的一条或多条链可同时造成抗 Xa 活性和抗 IIa 活性的下降。因此，在施用疗程期间，抗 Xa 活性和抗 IIa 活性可保持相对恒定。因此，在一些方面，本文提供的 LMWH 制剂可在施用 LMWH 的疗程期间维持相对恒定的抗 Xa 活性与抗 IIa 活性的比值，例如在约 30、60、120、180、240、300 分钟的时期内抗 Xa 活性与抗 IIa 活性的比值的变化不超过约 ± 1.5 、 ± 1 、 ± 0.5 或 ± 0.2 。例如，如果初始抗 Xa 与抗 IIa 比值为 2，则在初始施用后第二时间（例如，在约 30、60、120、180、240、300 分钟）测量的比值优选小于 3，并优选等于 2 或在 2 附近。

[0335] 中和

[0336] 本文提供的 LMWH 制剂可通过硫酸鱼精蛋白中和。例如可通过施用鱼精蛋白中和至少 50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99% 或 100% 的抗 IIa 活性和 / 或抗 Xa 活性。硫酸鱼精蛋白是商购的，例如购自 Eli Lilly 和公司。例如，可通过标准凝结试验（例如本文进一步描述的 ACT 和 aPTT 试验）测定对抗 Xa 活性和抗 IIa 活性的中和。例如，每 100IU 血浆抗 Xa 活性的 LMWH 组合物施用约 1、2、3mg 剂量的硫酸鱼精蛋白。优选地，在施用硫酸鱼精蛋白后的 5、10、15、20、25 或 30 分钟之内，发生鱼精蛋白对抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性的中和。

[0337] 多分散性

[0338] 本文提供的 LMWH 制剂的多分散性为约 1.6 或更小，例如约 1.6 或 1.5 ~ 1.1，以及之间的数值。

[0339] 术语“多分散”或“多分散性”是指组合物的重均分子量 (Mw) 除以数均分子量 (Mn)。通过以下等式： $Mn = \sum c_i / (\sum c_i / m_i)$ 计算数均分子量 (Mn)。变量 c_i 是片段 i 聚合物的浓度， m_i 是片段 i 聚合物的分子量。针对包含多个片段的数据的色谱峰求和。在色谱峰与时间的坐标图中，一个片段的数据可表示为一条垂直直线。因此，可以将洗脱峰分成多个片段。数均分子量的计算依赖于各个片段数据的浓度和分子量。上文描述了测定重均分子量的方法，所述方法也用于测定多分散性。

[0340] 对于本文所述的任意范围，例如给定的结构或活性的范围，所述范围可以是公开的范围以及其它范围。例如，所述范围可以由一个范围（例如，给定的构建单元或活性）下限构建的范围与由另一个范围（例如，给定的构建单元或活性）上限构建的范围组合给出。

[0341] 所述“分离”或“纯化”LMWH 制剂基本不包含细胞物质或基本不包含来自衍生出 LMWH 的细胞或组织源的其它污染蛋白质，或在化学合成的情况下，基本不包含化学前体或其它化学试剂。所述“基本不包含”是指 LMWH 制剂的纯度至少为 50% (wt/wt)。在一个优

选实施方案中, LMWH 制剂具有小于约 30%、20%、10% 和更优选地 5% (折干计算) 的非肝素多糖、蛋白质或化学前体或其它化学试剂, 例如来自生产过程的这些物质。这些物质在本文中也称为“污染物”。可出现于本文提供的 LMWH 制剂中的污染物的实例包括但不限于钙、钠、肝素酶 (具有类似底物特异性的其它酶)、甲醇、乙醇、氯化物、硫化物、硫酸皮肤素和硫酸软骨素。

[0342] 监测 LMWH 制剂活性的方法

[0343] 可通过标准抗凝试验监测本文提供的 LMWH 制剂的活性。此类试验包括, 例如 ACT 和 aPTT, 这两种试验是医院, 特别是医院手术室的常规项目。

[0344] ACT 是用来监测肝素治疗有效性的试验。ACT 可在床边进行, 例如用于患有肺栓塞、进行体外膜肺氧合 (ECMO) 和血液透析的患者。ACT 最常用于外科手术之前、期间和之后, 例如心肺转流 (CPB) 手术、PCI 和支架置入。ACT 的参考值可在 70-180 秒的范围内。然而, 对于特定过程 (例如 CPB), 需要的范围可超过 400-500 秒。ACT 利用带负电的颗粒测定凝块形成的时间。可使用的多种颗粒的实例包括寅式盐 (具有约 100 ~ 170 秒的 ACT 正常长度)、高岭土 (具有约 90 ~ 150 秒的 ACT 正常长度) 和玻璃微粒 (具有约 190 ~ 300 秒的 ACT 正常长度)。测定 ACT 的适合机器包括, 例如 Hemochron and MedtronicHemoTec。

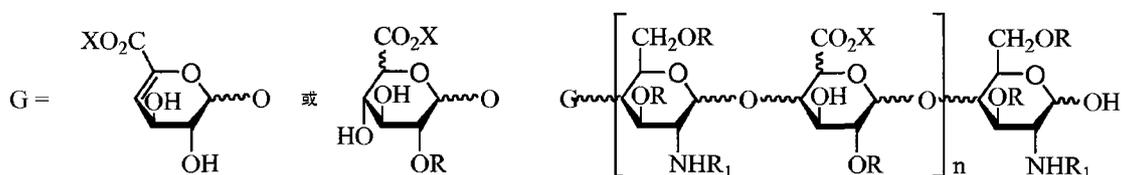
[0345] 在 aPTT (也被称为“部分促凝血激酶原激酶时间”或“PTT”) 试验中, 使用接触活化剂通过提供高分子量激肽原、激肽释放酶和 XIIa 因子发挥功能的表面来刺激 XIIa 因子的产生。容许此接触活化进行一段时间。随后, 加入钙以引发进一步反应并测定凝块形成所需的时间。

[0346] 需要磷脂以形成活化 X 因子和凝血素的复合物。可通过 IL TestTMAPTT-SP (液体) 测定 aPTT。aPTT 的参考值为约 25 ~ 35 秒。延长的 aPTT 说明由于例如肝素或 LMWH 处理, 需要长于预期的时间来形成凝结。

[0347] 制备 LMWH 制剂的方法

[0348] 本发明也设计了制备 LMWH 制剂, 例如制备本文所述 LMWH 制剂的方法。例如, 此类方法包括具有约 8 ~ 16 或 9 ~ 16 个二糖的平均链长的 LMWH 制剂的制备方法。所述方法包括提供具有小于 8 ~ 16 或 9 ~ 16 个二糖链长的 LMWH 制剂前体, 和加工 LMWH 制剂前体以获得具有约 8 ~ 16 或 9 ~ 16 个二糖的平均链长的 LMWH 制剂。优选地, 所述前体具有约 8 ~ 14 (例如 8 ~ 12) 个二糖的平均链长。例如, 所述 LMWH 制剂前体可具有以下结构:

[0349]



[0350] 其中, X 是单价或二价阳离子 (例如, Na 或 Ca),

[0351] R 是 H 或 SO₃X;

[0352] R₁ 是 SO₃X 或 COCH₃;

[0353] n = 2 ~ 45, 例如, 2 ~ 35;

[0354] 且所述组合物的 n 的平均值优选为 7 ~ 13 (例如, 7 ~ 11 或 8 ~ 12)。

[0355] 可通过包括盐沉淀和随后酶降解的方法获得此方法使用的 LMWH 制剂前体。在获

得 LMWH 制剂前体的方法中可使用单价或二价阳离子的盐。可使用的单价和二价阳离子的实例包括,例如钠、钾、铷、铯、钡、钙、镁、锶及其组合。所述盐是单价或二价阳离子的乙酸盐。获得 LMWH 前体的酶消化可包括使用切割未硫酸酯化糖醛酸中的糖苷键的一种或多种酶。示例性的酶包括肝素酶 III、肝素酶 III 的突变体和来自多形拟杆菌的 HSGAG 裂解酶 III。肝素酶 III 描述于,例如美国专利第 5,681,733 号和第 5,919,693 号。肝素酶 III 突变体描述于美国专利第 5,896,789 号。优选的肝素酶 III 突变体是那些将组氨酸残基 His36、His105、His110、His139、His152、His225、His234、His241、His424、His469 和 His539 中的一个或多个取代为丙氨酸的肝素酶 III 突变体。

[0356] 可根据大小进行分离,例如体积排阻色谱、离子交换色谱或过滤来处理 LMWH 制剂前体。可在分离之前或之后使用其它加工步骤以获得药物产物。

[0357] 术语“药物产物”是指具有所需纯度并被配制以药用的 LMWH 制剂。

[0358] 术语“原料药”是指具有用于药物应用但不一定是最终制剂形式的、具有多糖组分的 LMWH 制剂和 / 或包含一种或多种非产物污染物(例如,一种或多种无机产物(例如硫酸盐、氯化物)、蛋白质污染物、加工副产物(例如肝素酶、钙、钠))。

[0359] 生产本文提供的 LMWH 制剂的其它方法包括提供来自于包含葡胺聚糖(GAG)的样品(例如 UFH)的“快速移动组分”。可按以下方式生产所述快速移动组分:

[0360] (1) 对包含 GAG 的样品(例如 UFH)进行第一次沉淀以获得第一上清液:例如,使用极性有机溶剂(例如,如乙醇的醇类)、极性非有机溶剂(例如水)和盐(例如,优选如乙酸钠的钠盐)对包含 GAG 的样品(例如 UFH)进行第一次沉淀以获得第一上清液;

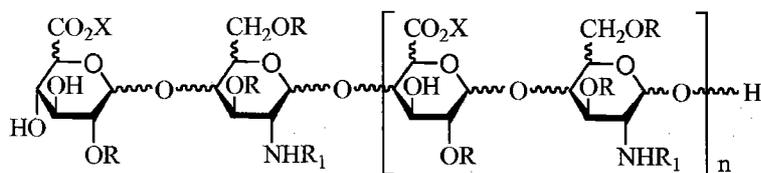
[0361] (2) 对所述第一上清液进行第二次沉淀以获得沉淀物:例如,使用极性有机溶剂(例如,如乙醇的醇类)和极性非有机溶剂(例如水)对所述第一上清液进行第二次沉淀以获得沉淀物(此沉淀物包含快速移动组分);

[0362] (3) 并优选地溶解所述沉淀物。

[0363] 也可将通过产生基本等价片段(例如具有 9 ~ 16 个二糖的平均链长度的片段)的其它方法生产的包含(GAG)片段的样品(例如,UFH)用作快速移动组分。

[0364] 在一些实施方案中,所述快速移动组分具有以下结构:

[0365]



[0366] 其中,

[0367] X 是 Na 或 Ca;

[0368] R 是 H 或 SO₃Na;

[0369] R₁ 是 SO₃Na 或 COCH₃;

[0370] n = 2 ~ 50, 例如, 2 ~ 40;

[0371] 且所述组合物的 n 的平均值优选为 9 ~ 16 或 8 ~ 15。

[0372] 此组合物可作为 LMWH 生产过程中的中间产物产生,例如作为沉淀产物以提供快速移动组分(如本文的讨论)。

[0373] 可将快速移动组分进一步加工以提供本发明的 LMWH。快速移动组分的加工可包括使用切割未硫酸酯化糖醛酸中的一个或多个糖苷键（例如，与 N-乙酰葡萄糖胺残基临近的未硫酸酯化糖醛酸的一个或多个糖苷键）的化学试剂 或酶消化所述快速移动组分，例如以获得具有本文所述质量和特征的制剂。可通过以下步骤评估酶对底物的特异性：1) 使用具有不同硫酸酯化密度的两种 HSGAG 底物（例如，肝素和硫酸乙酰肝素）对酶活性进行功能筛选，从而选出与肝素相比对硫酸乙酰肝素优选的酶；2) 对步骤 1 的切割后底物进行片段作图 (fragment mapping) 以评估底物特异性；3) 使用酶切割 LMWH (例如 M118-REH) 步骤 I 中间产物或达肝素，随后 4) 使用体外试验评估切割后底物的抗 Xa 活性和抗 II 活性；和 5) 使用凝胶渗透色谱法 (GPC) 和 / 或带多角度光散射检测的体积排阻色谱法 (SEC-MALS) 评估切割后底物的分子量分布（或平均链长）。

[0374] 步骤 1 评估了酶作为 HSGAG 裂解酶的能力以及其对低硫酸化底物（例如硫酸乙酰肝素）是否优选，其中通过在切割产物的非还原末端产生非饱和 C4-C5 键的能力来鉴定其作为 HSGAG 裂解酶的能力。可通过监测 232nm 处的 UV 吸收，通过分光光度法监测酶活性。对此波长的吸收表明了切割产物非还原末端不饱和糖醛酸的形成。可通过动力学方式（产物形成的起始速率）和根据完全消化（约 12 ~ 15 小时）后总产物的形成来检测酶活性。优选的酶具有高于肝素约 2 倍的硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate) 优选性，以及高于 2 倍以上（例如，3 ~ 5 倍）的总活性差异。

[0375] 第二步评估酶的切割特异性。适合于制备本文所述 LMWH 组合物的酶优选切割肝素或硫酸乙酰肝素的未硫酸酯化区域。如果使用的底物是 UFH，此优选性表现为对底物的明显不完全降解（由较长寡糖的存在表明），以及产生具有低硫酸酯密度的二糖。相反，如果底物是硫酸乙酰肝素，降解产生较多数量的二糖，这说明较高的切割频率。

[0376] 可如本文其它部分所述进行剩余的步骤 3 ~ 5。

[0377] 酶的实例包括肝素酶 III，肝素酶 III 的突变体和来自多形拟杆菌的 HSGAG 裂解酶。在一些实施方案中，使用将肝素酶 III 氨基酸序列中第 225 位残基的组氨酸替换成丙氨酸的突变肝素酶来至少部分地加工（或处理）快速移动组分。本文中，这个酶也被称为“M011”。

[0378] 经降解的 LMWH 制剂可以是终产物，例如原料药或药物产物，或经进一步加工获得终产物，例如原料药或药物产物。浓缩的 LMWH 制剂可经进一步加工，例如通过一种或多种根据大小进行的分离（例如，通过体积排阻色谱、离子交换色谱和过滤）和过滤进行加工。优选地，通过根据大小进行的分离进一步加工浓缩的 LMWH 制剂，且由此步骤获得的 LMWH 制剂具有约 9 ~ 16 个二糖的平均链长。

[0379] 评估或加工 LMWH 制剂的方法

[0380] 毛细管电泳

[0381] 酶

[0382] 使用 CE 对 LMWH 制剂（例如 M118-REH 制剂）进行分析包括，例如使用一种或多种肝素降解酶进行消化。例如，肝素降解酶可以是一种或多种肝素酶、肝素裂解酶、HSGAG 裂解酶、也可以降解肝素的被称作 GAG 裂解酶的裂解酶，和 / 或被称作水解酶、硫酸酯酶 / 磺基氢化酶、或糖基水解酶 / 糖苷酶的多肽。例如，可以用以下的一种或多种酶消化 LMWH 制剂：不饱和葡萄糖醛酸基水解酶（例如肝素黄杆菌 (*F. heparinum*) Δ 4,5 葡

糖醛酸酶、多形拟杆菌 Δ 4,5 葡糖醛酸酶)、葡糖醛酸基水解酶(例如哺乳动物 α -艾杜糖醛酸酶、 β -葡糖醛酸酶)、磺基氢化酶(例如肝素黄杆菌 2-0-硫酸酯酶、6-0-硫酸酯酶、3-0-硫酸酯酶、多形拟杆菌 6-0-硫酸酯酶、粘蛋白脱硫酸酶、哺乳动物 N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯酶、哺乳动物艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶)、N-磺酰胺酶(例如肝素黄杆菌 N-磺酰胺酶、哺乳动物乙酰肝素-N-硫酸酯酶)、芳基硫酸酯酶、氨基己糖苷酶、糖基水解酶(例如内切-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶)、肝素酶(例如肝素黄杆菌肝素酶 I、肝素黄杆菌肝素酶 II、肝素黄杆菌肝素酶 III、肝素黄杆菌肝素酶 IV)、内切葡糖醛酸酶(例如哺乳动物乙酰肝素酶)、肝素/乙酰肝素硫酸酯裂解酶(例如多形拟杆菌 HSGAG 裂解酶 I、多形拟杆菌 HSGAG 裂解酶 II、多形拟杆菌 HSGAG 裂解酶 III、多形拟杆菌 HSGAG 裂解酶 IV) 和其功能性片段和变体。也可以包括来自于除肝素黄杆菌(又名,解肝磷脂土地杆菌 *Pedobacter heparinus*) 或多形拟杆菌之外的微生物的上述多肽(例如肝素酶或肝素/肝素硫酸盐裂解酶)。例如,嗜盐古菌(*Haloarcula marismortui*)、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae*、中间链球菌 *Streptococcus intermedius*、猪链球菌 *Streptococcus suis*、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*、沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris*、维氏硝化杆菌 *Nitrobacter winogradskyi*、汉堡硝化杆菌(*Nitrobacter hamburgensis*)、慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)、苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)、百脉根根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)、*Spingobacterium* sp.、牛种布鲁氏菌(*Brucella abortus* biovar)、羊种布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)、*Solibacter usitatus*、荚膜酸杆菌(*Acidobacterium capsulatum*)、*Microbulbifer degradans*、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomonascepacia*)、*Geobacter metallireducens*、普氏菌(*Prevotella* sp.)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)、*Anaeromyxobacter dehalogenans*、*Rhodopirellula baltica*、海洋小梨形菌(*Pirellula marina*) 和/或隐球出芽菌(*Gemmata obscuriglobus*)。

[0383] 优选地,用于消化的至少一种酶是由于可在肝素中的特异连接处进行切割而被选择出来的。例如,所述酶可以是肝素酶 I 和/或 HSGAG 裂解酶 I。在一个实施方案中,使用肝素黄杆菌肝素酶 I 降解 LMWH 制剂。在另一个实施方案中,使用多形拟杆菌 HSGAG 裂解酶 I 降解 LMWH 制剂。

[0384] 在降解中可选择使用其它酶,这些酶可分解仅使用肝素酶 I、II 和 III 时不能分解的结构。本文所述的任何酶均可替换成具有等价功能活性的酶。

[0385] 在一个优选实施方案中,进行完全消化或至少足以提供具有表 10A 中列出的全部产物的消化物的消化,并且优选基本不含有未消化的物质。

[0386] 在消化之前,可冻干样品。例如,可在真空箱中干燥样品,例如在约 20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、43°C、46°C、49°C、52°C 或 55°C 干燥约 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 或 24 小时。例如,可在以下条件之一冻干和/或干燥样品:40°C 下 12 小时;46°C 下 8 小时;49°C 下 6 小时;52°C 下 4 小时。可以约 1、2、5、10、20、50、100、200 或 500mg/mL 的浓度将样品悬浮在水或适合的缓冲液(例如,1mM 乙酸钙、25mM 乙酸钠, pH 7.0 和 5% 甘氨酸)中。

可向样品中添加一种或多种肝素降解酶。在一些实施方案中,可向样品中添加肝素酶 I 或 HSGAG 裂解酶 I (或这些酶的组合)、肝素酶 II 或 HSGAG 裂解酶 II (或这些酶的组合) 和肝素酶 III 或 HSGAG 裂解酶 III (或这些酶的组合)。将所述样品在约 18°C、25°C、30°C、37°C 或 45°C 的温度下降解约 6、12、16、18、20 或 24 小时,例如约 25°C 下 24 小时;30°C 下约 18 小时;约 37°C 下 12 小时。

[0387] 消化之后,例如使用 Ni²⁺ 柱、体积排阻柱、透析、超滤等,从样品混合物中除去所述一种或多种酶。可在消化后通过加热(例如在 65°C 加热 20 分钟)对一种或多种酶进行灭活。在分析前可将样品在 -85°C、-70°C、-20°C、4°C、18°C 或 25°C 储存一段时间。

[0388] 可通过多种方式检测本文所述方法分离的物质,例如通过紫外吸收(例如,在约 232nm 的波长下的吸收)、蒸发光散射、荧光、脉冲安培检测和质谱检测法。在一些实施方案中,可对同一样品进行两种或多种方式的检测,例如串联或并联的检测。

[0389] 可使用其它酶消化法来消化样品。例如,肝素酶 I 或 HSGAG 裂解酶 I (或这些酶的组合)、肝素酶 II 或 HSGAG 裂解酶 II (或这些酶的组合)、肝素酶 III 或 HSGAG 裂解酶 III (或这些酶的组合) 和 2-O 硫酸酯酶、 Δ 4,5 葡萄糖醛酸酶的组合和 / 或肝素酶 I 或 HSGAG 裂解酶 I (或这些酶的组合)、肝素酶 II 或 HSGAG 裂解酶 II (或这些酶的组合)、肝素酶 III 或 HSGAG 裂解酶 III (或这些酶的组合) 的组合可用于消化,并且通过例如上述方法进行检测。

[0390] 使用 Agilent 3D 毛细管电泳仪器分析消化产物。所述毛细管为延长光路的裸露熔融硅毛细管,内径 75 μ m,有效长度 72cm。使用 pH2.5 的 Tris (50mM),10 μ M 硫酸葡聚糖作为 CE 缓冲液。在 30mbar 压力下注射样品 20 秒。在负极性下进行分离,并使用 310nm 作为参考波长在 232nm 下监测分析物。依次使用水、1N 氢氧化钠、水和分离缓冲液对新毛细管进行预处理。每次样品分析前,使用缓冲液将毛细管预处理 5 分钟。

[0391] 可用于本文所述方法的其它信息可在以下文献中找到,例如 Linhardt et al. (1988) *Biochem. J.*, 254 :781-787 ;Chuang et al. (2001) *J. Chromatogr. A*, 932 :65-74 ; 和 Yates et al. (2004) *J. Med. Chem.*, 47 :277-280, 和 Rhomberg et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(8) :4176-81.

[0392] 毛细管电泳

[0393] 可使用 CE (例如使用无涂层熔融硅毛细管) 分析 LMWH, 例如本文所述的 LMWH 制剂。在低 pH 的条件下,分离几乎完全由分析物的电泳迁移性控制。考虑到所有 LMWH 相关的糖类由于羧酸酯和硫酸酯部分而具有净负电荷,分离在反极性条件下进行。此外,在低 pH (pH2.5) 缓冲液中补充硫酸葡聚糖可防止肝素样阴离子物质的非特异性吸收,从而保证对称的峰形和精确的定量。

[0394] 可使用一系列的 5 种消化物 (本文其它部分详细讨论) 来分离 LMWH 制剂中的物质;在向各消化物中添加萘单磺酸盐内标后,进行毛细管电泳。

[0395] 在 CE 中分离出 14 中的单组分 (参见,例如本文表 10)。

[0396] 按如下方式评估成分分析法中的质量回收 (mass recovery)。此分析发生于两个水平:(1) 酶促消化后的质量回收和 (2) 经毛细管电泳分离后的质量回收。

[0397] NMR

[0398] 可使用二维核磁共振谱 (2D NMR) 的方法部分地分辨并鉴定信号重叠最小的信号。

整合 2D NMR 信号,随后进行简单计算可促进多糖混合物单糖成分的定量分析,例如,对如本文提供的那些 LMWH 制剂的分析。

[0399] 此外,2D NMR 可提供关于二糖组分(例如 H-U 二糖)连接环境的信息,从而对二糖连接提供分析(包括定性分析和定量分析)。在一些实施方案中,2D NMR 分析可提供关于 H-U 连接的差向异构状态的信息,从而提供例如处于差向异构状态是艾杜糖醛酸残基还是葡萄糖醛酸残基(即 I 或 U)的信息。

[0400] 在一些实施方案中,2D 质子-碳相关谱(HSQC)试验可对一种或多种葡胺聚糖提供定量成分分析。例如,在一些实施方案中,2D NMR 分析可提供关于单糖还原末端最邻近序列的信息。此信息可提供,例如多糖混合物(例如,如本文所述 LMWH 制剂的 LMWH)中出现特定单糖的周围序列。

[0401] 在一些实施方案中,2D NMR 法可区分内部残基和还原末端残基。特别地,对于本文所述的那些 LMWH,可专门鉴定还原 N-乙酰葡糖胺的可测定的量。

[0402] 在一些实施方案中,2D NMR 分析可提供关于 LMWH 链非还原末端的信息,即由酶促消化产生的 Δ UAp2-OH 的量。

[0403] 在一些实施方案中,可使用 2D NMR 评估多糖混合物中一种或多种杂质(例如,硫酸皮肤素)的存在。例如,质子 NMR 中 2.06 ~ 2.09ppm 处信号的缺失可用于确认硫酸皮肤素的存在水平不大于仪器的检测水平(例如,大于约 1%的水平)。

[0404] 在一个优选实施方案中,使用 2D NMR 评估糖的结构,例如评估使用 D₂O 交换,冷冻干燥过夜,并重溶于 D₂O 中的多糖混合物样品。随后,将所述样品放置在分析用 NMR 管中,并使用装备有 5-mm TXI 探针的 BrukerAvance 600MHz 分光计在 303K 进行分析。在数据获得(acquisition)期间使用去碳偶合记录梯度增强的 HSQC 谱。随后,通过对间接 13C 维度中每 256 个增量进行 16 次扫描获得所述数据。将极化转移延迟设定为 2.941ms 以获得 155Hz IJCH 耦合的最佳转移。

[0405] 通常随后对数据进行处理,例如在傅立叶转化前应用平方余弦函数将 1Kx 256 大小的矩阵由 0 填充至 2K x 1K。例如,使用 Mestrec 4.5 软件对交叉峰进行积分,并使用单正峰用于积分。使用 N-硫酸酯化葡糖胺的 H2/C2 峰(3.26/60.5ppm)对积分进行归一化。通常使用公开的化学转换以及通过 COSY 和 TOCSY 实验的实验性归属来对峰进行归属。

[0406] 使用异头交叉峰面积计算成分百分数,其中所有的糖醛酸残基均具有类似的 IJCH 偶联,所有的葡糖胺也是如此。对于由重叠而妨碍其精确定量的葡糖胺异头峰,则对 H2/C2 信号进行积分。每种单糖的量表示为占总葡糖胺或糖醛酸含量的百分比。由 H6/C6 信号的积分计算 6-O 硫酸酯与 6-O 脱硫酸酯的比值。

[0407] 表 11A 提供了成分百分数数据。

[0408] 可用于本文方法的其它信息可发现于,例如 Guerrini et al. (2005) Anal. Biochem., 337 :35-47。

[0409] 药物组合物

[0410] 本发明提供了包含与药学上可接受的载体一同配制的本文所述 LMWH 制剂的组合物,例如药学上可接受的组合物。

[0411] 本文所用“药学上可接受的载体”包括任意和所有的溶剂、分散介质、等渗吸收延迟剂以及生理上相容的类似物。所述载体可适合用于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、直肠、

脊髓或表皮给药（例如，通过注射或输注）。

[0412] 本发明的组合物可以是多种形式。这些形式包括，例如液体、半固体和 固体剂型，例如液体溶液（例如，可注射和可输注的溶液）、分散液或悬浮液、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预定的给药方式和治疗应用。通常优选组合物的形式是可注射和可输注的溶液。优选的给药模式是肠胃外给药（例如，静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内给药）。在一个优选实施方案中，通过静脉内输注或注射施用 LMWH 制剂。在另一个优选实施方案中，通过肌肉内或皮下注射使用 LMWH 制剂。

[0413] 本文所用短语“胃肠外施用”和“胃肠外给药”是指肠和局部给药之外的给药模式，该模式通常通过注射，并包括而限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、玻璃体内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜上和胸骨内注射和输注。

[0414] 治疗性组合物通常应为无菌，并在生产和储存条件下稳定。可将所述组合物配制成溶液、微乳剂、分散液、脂质体或适合于高浓度的其它有序结构。可通过向具有上述一种成分或成分组合的合适溶剂中加入所需量的活性化合物（即 LMWH），随后通过过滤杀菌制备无菌注射溶液。通常，通过向包含基本分散介质和所需的上述其它成分的无菌溶剂中添加活性化合物来制备分散液。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉的情况下，优选的制备方法是真空干燥法和冻干法，该方法从其先前的过滤除菌溶液中获得活性成分和任意其它所需成分的粉末。例如通过使用如卵磷脂的涂层；在分散液的情况下，通过保持所需的粒径；以及通过使用表面活性剂，可保持溶液的适当流动性。可通过向组合物加入延缓吸收的试剂（例如，多种聚合物、单硬脂酸盐和明胶）获得可注射组合物的延长吸收。

[0415] 可通过本领域已知的多种方法施用 LMWH 制剂，尽管对于很多治疗性应用，优选的给药途径 / 模式是静脉注射或输注。技术人员可理解，所述给药途径 / 模式可依照期望结果进行改变。在特定实施方案中，可使用阻止活性化合物快速释放的载体制备所述活性化合物，例如控释制剂，包括植入剂、透皮贴和微胶囊化给药系统。可使用生物可降解性、生物相容性聚合物，例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原磷酸酯和聚乳酸。此类制剂的很多制备方法已取得专利或为本领域技术人员所熟知。参见，例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0416] 注射制剂可存在于单位剂量形式（例如，安瓿）或多剂量容器中（例如，具有添加的防腐剂）。所述组合物可采用，例如油性或水性溶剂的悬浮液、溶液或乳液的形式，并可包含配制试剂，例如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0417] 在特定实施方案中，可口服本文提供的 LMWH 制剂，例如与惰性稀释剂或可同化的食用载体一起口服。也可将所述化合物（以及其它需要的成分）装入硬或软壳明胶胶囊，压缩成片剂，或直接添加到受试者的饮食中。对于治疗性口服，可将所述化合物加入到赋形剂中，并以吸收片剂、口含片、药片、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆、薄片剂和类似形式使用。为了通过肠胃外施用之外的途径来施用本发明的化合物，有必要使用材料包被所述化合物，或与所述化合物共施用以阻止其失活。

[0418] 向糖丸核提供适合的糖衣。处于这个目的，可使用浓缩的糖溶液，该糖溶液可任选地包含阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、Carbopol 胶、聚乙二醇和 / 或二氧化钛、漆溶液

(lacquer solution) 以及合适的有机溶剂或溶剂混合物。可向片剂或糖衣中添加染料或色素以鉴别或表征活性化合物剂量的不同组合。可用于口服的药物组合物包括由明胶制造的推送式胶囊、以及由明胶和增塑剂（例如甘油或山梨醇）制造的密封软胶囊。推送式胶囊可包含与填料（例如乳糖）、结合剂（例如淀粉）和 / 或润滑剂（例如滑石或硬脂酸镁）以及任选地稳定剂混合在一起的活性成分。在软胶囊中, 活性化合物可溶解或悬浮于适合的液体中, 例如油脂、液态石蜡或液态聚乙二醇。此外, 可添加稳定剂。也可使用口服的微球制剂。本领域已对此类微球做出详细定义。所有用于口服的制剂都应该是适合此类施用的剂量。

[0419] 对于经口腔施用, 所述组合物可采用以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0420] 对于吸入式施用, 可使用适合的推进剂（例如, 二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适合的气体）由加压包或喷雾器方便地递送气溶胶喷雾形式的 LMWH 制剂。在加压气溶胶的情况下, 可通过提供阀门以递送额定量的方式确定剂量单位。用于吸入器或吹药器的明胶胶囊或药包经过配制可包含所述化合物以及适合的粉末基料（例如, 乳糖或淀粉）的粉状混合物。此外, 用于吸入疗法的干粉制剂也在本发明的范围之内。可按 WO 02/32406 的公开制备此类干粉制剂。

[0421] 也可将所述组合物制备成经直肠或阴道的组合物, 例如栓剂或保留性灌肠剂, 例如包含常规栓剂基料（例如可可脂或其它甘油酯）的栓剂或保留性灌肠剂。

[0422] 除上文所述组合物之外, 也可将化合物制备成库存式制剂。可使用适合的聚合或疏水材料（例如, 可接受的油的乳液）或离子交换树脂制备此类长效制剂, 或将其制备成微溶性衍生物, 例如微溶性盐。

[0423] 所述药物组合物也可包含适合的固体或凝胶相载体或赋形剂。此类载体或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、多种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和如聚乙二醇的聚合物。

[0424] 可用于非肠胃外给药（例如, 非侵入式给药）的组合物的实例包括: 由吸入器向肺定量给药的组合物; 具有处方剂量单位的口服片; 透皮递送单位剂量的透皮贴; 以及经直肠或阴道递送所需单位剂量的栓剂。所述组合物可包含在容器、包装或带有施用说明书的配药器中。

[0425] 也可使用短期或长期植入装置施用所述 LMWH 制剂。可在皮下植入所述制剂, 或将其植入到组织或器官中（例如, 冠状动脉、颈动脉、肾动脉和其它外周动脉、静脉、肾、心脏、角膜、玻璃体、大脑等）, 或将其植入到组织和器官附近的生理空间中（例如, 肾囊、心包膜、胸腔或腹膜腔）。

[0426] 可使用所述 LMWH 制剂包被多种医疗器械。例如, 可使用所述 LMWH 制剂包被支架或体外电路。LMWH 制剂的此类制剂可包括使用, 例如控释微珠、凝胶或微球, 以及多种聚合物（例如 PLGA、纤维素、海藻酸盐或其它多糖）。

[0427] 可调整给药策略以产生最佳期望反应（例如, 治疗反应）。例如, 可以单次浓注施用, 可在一段时间内使用多个分次剂量或根据治疗状况的要求按比例减少或增加剂量。制备单位剂型的肠胃外给药组合物以利于施用和剂量的一致性, 这一点特别有利。本文所用的单位剂型是指适合于向待治疗受试者提供单位剂量的在物理上分散的单位, 每个单位包含经过计算可产生期望治疗效果的预定量的活性化合物以及所需的药学载体。本发明单位

剂型的说明受控于并直接依赖于 (a) 所述活性化合物的独特特征以及希望达到的特别治疗效果, 和 (b) 组合此类活性化合物用于个体敏感性治疗领域本身存在的局限性。

[0428] 应注意剂量值可随着需缓解病症的类型和严重性改变。应进一步理解, 对于任意特定受试者, 应根据个体需要以及施用所述组合物或监测所述组合物施用的人员的专业判断来随时间调整特定的给药策略。

[0429] 本发明的药物组合物可包括“治疗有效量”或“预防有效量”的 LMWH 制剂。“治疗有效量”是指在必要时间后达到期望治疗结果的有效剂量。LMWH 制剂的治疗有效量可根据多种因素改变, 例如疾病状态、年龄、性别、个体体重以及在个体中引发期望反应的 LMWH 制剂。治疗有效量也可以是其中 LMWH 制剂的任意毒性或有害作用超出治疗有益作用的量。优选与未处理的受试者相比, “治疗有效量”抑制可测量的参数, 例如通过 ACT 和 aPTT 测定至少约 20% 地抑制凝结或血栓参数, 更优选至少约 40%, 再优选至少约 60%, 和更优选至少约 80% 地抑制抑制凝结或血栓参数。可在动物模型系统中评估所述化合物抑制可测参数 (例如凝结或血栓参数) 的能力以预测其在人体中的效力。或者, 可通过检测所述化合物在体外试验中的能力对其此类性质做出评估。经静脉施用 LMWH 制剂的示范性剂量为约 1IU/kg ~ 200IU/kg, 例如 1IU/kg、2IU/kg、3IU/kg、4IU/kg、5IU/kg、6IU/kg、7IU/kg、8IU/kg、9IU/kg、10IU/kg、11IU/kg、12IU/kg、13IU/kg、14IU/kg、15IU/kg、16IU/kg、17IU/kg、18IU/kg、19IU/kg、20IU/kg、21IU/kg、22IU/kg、25IU/mg、30IU/kg、40IU/kg、50IU/kg、70IU/kg、100IU/kg、125IU/kg、150IU/kg、175IU/kg、200IU/kg。经静脉施用 LMWH 制剂的其它示范性剂量为约 0.03mg/kg ~ 0.45mg/kg, 例如 0.03mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.22mg/kg、0.25mg/kg、0.27mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.37mg/kg、0.4mg/kg、0.44mg/kg, 优选约 0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.4mg/kg、0.44mg/kg、0.47mg/kg、0.5mg/kg、0.55mg/kg、0.60mg/kg、0.7mg/kg, 优选约 0.30 ~ 0.50mg/kg, 例如 0.30mg/kg、0.35mg/kg、0.40mg/kg、0.42mg/kg、0.44mg/kg、0.47mg/kg or 0.50mg/kg。

[0430] “预防有效量”是指在必要时间后达到期望预防结果的有效剂量。通常, 由于预防性剂量用于疾病早期或疾病发生之前的受试者, 因此预防有效量可小于治疗有效量。

[0431] 包含本文提供的 LMWH 制剂的试剂盒也包含在本文的范围之内。所述试剂盒可包含一种或多种其它元件: 使用说明书、其它试剂, 例如治疗剂或硫酸鱼精蛋白、用于制备施用的 LMWH 制剂的装置或其它材料、药学上可接受的载体, 以及用于向受试者施用的装置或其它材料。使用说明书可包括利用凝结试验 (例如 ACT 和 aPTT) 监测抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性的说明。所述说明书可包括对治疗性应用的说明, 包括建议剂量和 / 或给药模式, 例如对于患有病变 (例如本文所述病变) 的患者的建议剂量和 / 或给药模式。其它说明书可包括对使用硫酸鱼精蛋白中和抗 Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性的说明。所述试剂盒可进一步包含经适当的配制包含在一个或多个合适的单独药物制剂中的至少一种其它试剂, 例如诊断或治疗性试剂 (例如本文所述的诊断或治疗性试剂)。

[0432] 预防性和治疗性应用

[0433] 所述 LMWH 制剂可用来治疗受试者。本文所使用的术语“治疗”(treat, treatment) 定义为向受试者 (例如患者) 应用或施用 LMWH 制剂, 或向来自受试者 (例如患者) 的分离组织或细胞应用或施用 LMWH 制剂, 随后将所述分离组织或细胞返还到患者体内。所述受试

者可以使患有病变（例如本文所述病变）、病变症状的患者或具有易患病变体质的患者。所述治疗可以是痊愈、治愈、缓解、减轻、改变、补救、改善、缓和、改进或影响所述病变、病变症状或具有易患所述病变体质。本文中“受试者”为脊椎动物，例如人类，非人类的灵长动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物。所述受试者可以是，例如实验动物、兽医用动物或人类受试者。所述治疗可以是治疗性的，例如痊愈、治愈、缓解、减轻、改变、补救、改善、缓和、改进或影响所述病变或病变症状的治疗，例如减少、减轻或改进现有的不利病症或其症状，或者所述治疗是预防性的，例如延迟（例如阻止）不利病症或其症状出现的治疗。

[0434] 肝素和 LMWH 具有多种治疗性应用。本文提供的 LMWH 制剂可用于治疗任何类型的可由肝素或 LMWH 疗法有效治疗的病症。因此，所述制剂和方法可用于多种体外、体内或转体 (*ex vivo*) 方法。例如，已知肝素和 LMWH 可用于预防和治疗痴呆（例如，阿兹海默症）、与凝血相关的病变（例如 DVT 和 PE）、纤维化病变（例如主要器官纤维化、纤维增生性病变和外伤相关的疤痕）、血栓症（例如 ACS、稳定型或不稳定型心绞痛，MI（例如 STEMI 和 NSTEMI））或心血管疾病（动脉硬化症）、血管病症或心房纤颤、过敏性反应或呼吸系统病变（例如哮喘、肺气肿、成人呼吸窘迫综合征（ARDS）、囊肿性纤维化或肺再灌注损伤）、循环性休克和相关病症、遗传性病变、癌症或转移性病变、脓血症、狭窄和再狭窄，以及骨质疏松症。本文提供的 LMWH 制剂也可用于患有骨折（例如髌骨骨折）的受试者，或接受外科手术（例如器官移植、整形外科手术、髌关节替换、膝关节替换，PCI、支架置入、血管成形术和 CABG）之前、期间或之后的受试者。这些病变均为本领域所熟知并描述于，例如 Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill, Inc., New York)，其并入本文作为参考。HLGAG 组合物在多种治疗方法中的应用描述并总结于 Huang, J. and Shimamura, A., Coagulation Disorders, 12, 1251-1281 (1998)。

[0435] 因此，LMWH 制剂可用于治疗或预防与凝血相关的疾病。当凝血途径倾向于过量凝集的不平衡状态时，其结果是血栓趋势的形成，通常表现为心脏病发作、中风、DVT、ACS、稳定型和不稳定型心绞痛以及心肌梗死。本文所用“与凝血相关的疾病”是指可由组织血液供应的中断或减少导致的局部炎症表征的病症，所述血液供应的中断或减少可能是例如由于负责向组织供血的血管堵塞的结果（例如在心肌梗死、脑梗死或外周血管疾病中观察到的血管堵塞），或由与血栓形成相关的病症（例如心房纤颤、DVT 或 PE）的结果。经历手术、感觉缺失和长期卧床休息或其它静止状态的人常易患上深静脉血栓（DVT）疾病，这是下肢和 / 或骨盆中静脉血的凝集。这种凝集发生的原因是由于下肢缺乏输送静脉血（停滞的）所需的肌肉运动、局部血管损伤或高凝状态。如果血凝块移动到肺而造成“肺栓塞”或干扰心血管循环，这种症状可能危及生命。一种治疗方法包括使用抗凝血剂。

[0436] 所述方法可用于治疗血栓性疾病和心血管疾病。所述心血管疾病包括但不限于动脉硬化症和心房纤颤。心房纤颤是心律失常的常见形式，通常作为情绪压力的结果而产生或在手术、锻炼或急性酒精中毒之后发生。心房纤颤的特征是紊乱动脉活动和 ECG 上离散 P 波消失。这种紊乱活动可导致心房中的异常血流以及血栓的形成。这些血栓可发生栓塞，造成脑缺血和其它疾病。

[0437] 血栓性疾病包括但不限于 ACS（例如 MI）、稳定型和不稳定型心绞痛。心肌梗死是一种疾病状态，有时是在先前经动脉硬化症而窄化的冠状动脉中发生血栓阻塞后，冠状血流突然减少而造成的。例如吸烟、高血压和脂质累积的因素可产生或促进此类损伤。心绞

痛是由瞬时心肌缺血造成的。这种疾病通常与体重、压迫感、压力、窒息或胸腔下部憋闷感相关。所述病症通常是由运动或感情引发,但也在休息时发生。STEMI 也被称为“Q 波心肌梗死”,是指具有异常超声波心动图的 MI。NSTEMI,或“非 Q 波心肌梗死”与超声波心动图异常无关。稳定型心绞痛发生在特定量运动或活动后,其发生次数可以预测。不稳定型心绞痛可作为普通模式稳定型心绞痛的变体发生。它可包括休息时或较少运动后发生的胸痛,可较为严重或持续较长时间,或对硝化甘油的响应较小。不稳定型心绞痛意味着由于血管窄化加剧或由于冠状动脉中形成小血块而潜在地使血流进一步恶化。不稳定型心绞痛是即将发生心肌梗死的预警前兆。

[0438] 在血栓性疾病和心血管疾病的治疗中可单独使用所述 LMWH 制剂,或将其与降低心血管疾病风险或治疗心血管疾病的其它治疗剂组合使用。例如,组合疗法可包括一种或多种其它治疗剂(例如,一种或多种本文所述的治疗剂)与 LMWH 制剂的共配制和/或共施用。本文所用“组合”施用是指在患病受试者的疗程期间,向所述受试者递送两种(或多种)不同的治疗剂,例如在所述受试者被诊断患有疾病或被鉴定有患病风险之后和疾病被预防、治愈或消除之前,向所述受试者递送两种或多种治疗剂。在一些实施方案中,在第二治疗的递送开始时,第一治疗的递送仍在继续,也就是存在重叠。本文中有时将其称为“同时”或“同时递送”。在其它实施方案中,第一治疗的递送在其它治疗的递送开始之前结束。可进行这样的递送,在递送第二治疗时仍可检测到第一治疗的递送效果。其它治疗剂包括但不限于抗炎剂、抗血栓形成剂、抗血小板剂、纤维蛋白溶解剂、溶解血栓剂、降脂剂、直接凝血酶抑制剂、抗 Xa 抑制剂、抗 IIa 抑制剂、糖蛋白 IIb/IIIa 受体抑制剂和直接凝血酶抑制剂。可与本文提供的 LMWH 制剂组合使用的试剂实例包括比伐卢定、水蛭素、水蛭素原、Angiomax、agatroban、PPACK、凝血酶适配子、阿斯匹林、GPIIb/IIIa 抑制剂(例如,Integrelin)、P2Y12 抑制剂、噻吩吡啶、噻氯匹定和氯吡格雷。

[0439] 本文提供的 LMWH 制剂的通过标准抗凝试验(例如 ACT 和 aPTT)的可监测性以及可逆性为患者治疗提供了提高的适应性,例如同意住院和接受心血管手术可能性评估的那些患者。通过以下设想可突出此类优势。患者去医院称其患有与多种血栓性疾病(例如,ACS)相关的症状,包括稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛和 MI。本文提供的 LMWH 制剂的可检测性和可逆性使此类制剂可在患者接受心血管手术可能性评估时使用。如果确认患者将接受如 PCI 或支架防治的外科手术,则可在手术期间监测 LMWH 制剂的可监测性、LMWH 制剂的抗 Xa 活性和抗 IIa 活性,并且如果需要,可在手术期间或之后施用额外剂量的 LMWH 制剂以维持这些活性。如果确认患者将接受如 CABG 的外科手术,则可在手术之前使用硫酸鱼精蛋白中和 LMWH 制剂的抗 Xa 活性和抗 IIa 活性。此外,可监测患者的抗 Xa 活性和抗 IIa 活性以确保手术前活性得到充分降低。

[0440] 本文提供的 LMWH 制剂也可用于治疗血管病症。血管病症包括但不限于例如 DVT、外周脉管病、脑缺血的病变(包括中风和 PE)。脑缺血发作或脑缺血是脑供血受阻的缺血病症的一种形式。脑供血的中断或减少可能是多种因素的结果,包括内在阻断或血管自身闭塞、远起源的闭塞、灌注压力下降或血液粘稠度升高引起的脑血流不足,或蛛网膜下腔或大脑内组织中血管破裂。所述方法可用于治疗脑缺血。脑缺血可造成瞬时或永久性缺陷,经历脑缺血的患者所受的神经伤害取决于缺血事件的强度和持续时间。瞬时缺血发作是指脑血流仅被暂时地中断并导致暂时的神经伤害,通常可在 24 小时之内消除。TIA 的症状包括

面部或四肢麻木或虚弱,无法清晰交谈和 / 或理解他人的谈话、视觉损失或视力模糊以及眩晕感。永久性脑缺血发作,也被称为中风,是因血栓或栓塞导致脑血流的较长中断或减少引发的。中风导致神经细胞损失,通常造成可得到改善但不能痊愈的神经缺陷。

[0441] 血栓栓塞中风是由血栓或栓塞闭塞颅外或颅内血管造成的。因为通常很难辨别中风是由血栓症还是由栓塞症引发的,术语“血栓栓塞”用以涵盖由所述任一个机制引发的中风。

[0442] 所述方法还涉及使用本文提供的 LMWH 制剂治疗急性血栓栓塞中风。急性中风是由脑供血中断或减少的缺血事件导致的涉及神经损伤的内科综合症。

[0443] 单独使用 LMWH 制剂或将其与治疗中风的其它治疗剂组合使用的有效量是指足以减少中风造成的体内脑损伤的量。脑损伤的减少是指在对脑损伤的预防,所述脑损伤可发生在未经本文所述的治疗且经历过血栓栓塞中风的患者中。可使用多种生理参数评定脑损伤的减少,包括较小的梗死面积、提高的区域性脑血流以及降低的颅内压,例如,与治疗前患者、未经治疗的中风患者,或单独使用溶解血栓剂治疗的中风患者的参数进行比较。

[0444] 可单独使用 LMWH 制剂或与治疗凝血相关疾病的治疗剂组合使用。用于治疗凝血相关疾病的治疗剂的实例包括抗凝剂、抗血小板剂和溶解血栓剂。

[0445] 抗凝剂阻止血液成分凝结并以此阻止凝块形成。抗凝剂包括但不限于华法林、香豆素 (Coumadin)、双香豆素、苯丙香豆素、醋硝香豆素、双香豆素乙酯和茚二酮衍生物。“直接凝血酶抑制剂”包括水蛭素、水蛭素原、Angiomax、agatroban、PPACK、凝血酶适配子。抗血小板剂抑制血小板凝集,并常用于预防曾经历瞬时缺血发作或中风患者发生血栓栓塞中风。溶解血栓剂溶解可引发血栓栓塞中风的凝块。溶解血栓剂已用于治疗急性静脉血栓栓塞和肺栓塞,并为本领域所熟知(参见,例如 Hennekens et al, J Am Coll Cardiol ; v. 25(7 supp), p. 18S-22S(1995); Holmes, et al, J Am Coll Cardiol ;v. 25(7suppl), p. 10S-17S(1995))。

[0446] 本文所用肺栓塞是指与血凝块在肺动脉腔的滞留相关的疾病,可导致严重的呼吸官能障碍。肺栓塞常发生于下肢静脉,在腿部深静脉形成凝块并随后通过静脉循环到达肺部。因此,肺栓塞通常作为下肢静脉的深静脉血栓并发症而发生。肺栓塞的症状包括急性发作的呼吸短促、胸痛(呼吸时疼痛增加)以及心率和呼吸速率加快。一些个体可能发生咯血。

[0447] 所述制剂和方法也可用于治疗或预防动脉硬化症。现已在多种试验模型中证明肝素有利于动脉硬化症的预防。动脉硬化症是动脉硬化的一种形式,人们认为动脉硬化是大多数冠状动脉疾病、主动脉瘤和下肢的心房疾病的病因,并对脑血管疾病的发生起到作用。

[0448] 也可在透析程序和手术之前、期间或之后使用 LMWH 制剂。手术患者,特别是年龄超过 40 岁的患者,其发生 DVT 的风险增大。因此,可以预期本文提供的 LMWH 制剂在预防手术程序相关血栓症发生上的用途。除一般手术程序,例如经皮介入治疗(例如,经皮冠状动脉介入治疗(PCI))、PCTA、支架和其它类似方法、髋或膝替换、心肺转流手术、冠状动脉血管成形术、整形外科手术和假体置换手术之外,所述方法也可用于接受组织或器官移植程序或骨折(例如髌骨折)治疗的受试者。

[0449] 此外,本文提供的 LMWH 制剂可用于治疗呼吸系统疾病,例如囊肿性纤维化、哮喘、过敏反应、肺气肿、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺再灌注损伤和肺的缺血再灌注损伤。

[0450] 囊肿性纤维化是影响呼吸系统的慢性进行性疾病。囊肿性纤维化的一个严重后果是铜绿假单胞菌性肺感染,仅此一项即占到囊肿性纤维化发病和死亡的几乎 90%。用于治疗囊肿性纤维化的治疗剂包括治疗病原感染的抗菌剂。

[0451] 哮喘是以炎症、气管狭窄和气管对吸入剂反应性增加为特征的呼吸系统病变。哮喘通常与遗传性过敏或过敏症状相关,尽管并非唯一相关。哮喘也可包括运动引发的哮喘、对支气管刺激剂的支气管收缩反应、迟发型超敏反应、自身免疫性脑脊髓炎和相关疾病。哮喘通常由抗过敏原的 IgE 抗体的产生而引发。肺气肿是带有肺泡隔破坏的终末细支气管远端气道膨胀。肺气肿由弹性蛋白酶引发的肺损伤引发。成人呼吸窘迫综合征是涵盖伴有多种形态严重心房低氧血症的多种急性弥漫性肺损伤。脓血症是 ARDS 的最常见病因之一。

[0452] 炎症疾病包括但不限于自身免疫性疾病和遗传性过敏症。可使用本文提供的 LMWH 制剂治疗的其它炎症类型有难治性溃疡性结肠炎、克罗恩病 (Crohn' s disease)、多发性硬化症、自身免疫性疾病、非特异性溃疡性结肠炎、脓血症和间质性膀胱炎。

[0453] 所述 LMWH 制剂也可用于治疗纤维化疾病,例如主要器官纤维化、纤维增生性病变和外伤相关的疤痕。主要器官纤维化包括但不限于间质性肺疾病 (ILD)、肝硬化、肾病 (例如,糖尿病肾病和未经治疗的高血压肾病)、心脏病和眼部疾病 (例如,黄斑变性、视网膜病或玻璃体视网膜病变)。纤维增生性病变的实例包括系统性和局部硬皮病、瘢痕瘤和肥厚性疤痕、动脉硬化症、再狭窄、纤维肉瘤和类风湿关节炎。外伤相关疤痕的实例包括手术疤痕、化疗引发的纤维化、放射引发的纤维化、与损伤或烧伤相关的疤痕。

[0454] 在一个实施方案中,使用 LMWH 制剂抑制血管形成。本文使用的血管形成是指不恰当的新血管形成。“血管形成”常在肿瘤中发生,内皮细胞分泌一组内皮促有丝分裂生长因子造成内皮细胞伸长和增殖,从而导致新血管的产生。一些血管分裂原是内皮细胞生长因子相关的肝素结合肽。抑制血管生成可导致动物模型中的肿瘤衰退,说明其作为抗癌治疗剂的用途。血管形成疾病包括但不限于眼部新生血管疾病、骨质疏松症、牛皮癣、关节炎、癌症和心血管疾病。

[0455] 所述 LMWH 制剂也可用于抑制癌细胞生长和转移。因此,所述方法可用于治疗和/或预防受试者体内肿瘤细胞的增殖或转移。所述癌症可以是恶性或非恶性癌症。癌症或肿瘤包括但不限于胆道癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、上皮内瘤变、白血病、淋巴瘤、肝癌、肺癌 (例如,小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、黑素瘤、神经母细胞瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌和肾癌,以及其它癌和肉瘤。

[0456] 需要癌症治疗的受试者可能是具有高癌症发生可能性的受试者。这些受试者包括,例如具有遗传性异常的受试者 (现已证明遗传性异常的出现与较高的癌症发生可逆性相关) 以及暴露于致癌剂 (例如烟草、石棉或其它化学毒素) 的受试者,或曾接受癌症治疗并且在外观上癌症已经消退的受试者。

[0457] 向接受癌症治疗的受试者施用,所述 LMWH 制剂可在包含其它抗癌剂的混合物中施用。所述 LMWH 制剂也可在包含治疗放疗副作用的试剂 (例如止吐药、放疗保护剂等) 的混合物中施用。

[0458] 本文提供的治疗可进一步包含施用硫酸鱼精蛋白以中和所述 LMWH 制剂的抗 Xa 活性和/或抗 IIa 活性,例如当不再需要抗凝血或抗血栓形成活性时中和所述 LMWH 制剂的抗

Xa 活性和 / 或抗 IIa 活性。硫酸鱼精蛋白可按照每 100IU 抗 Xa 活性约 1、2、3mg 硫酸鱼精蛋白的剂量施用, 例如通过静脉施用。可使用例如本文所述的凝血试验测定抗 Xa 活性的 IU。

[0459] 其它实施方案

[0460] 通过以下实施例进一步说明本发明, 所述实施例不应被解释为对本发明的限制。本申请中引用的所有参考文献、专利和公开专利申请的内容均并入本文作为参考。

[0461] 实施例

[0462] 生产 M118-REH 的方法

[0463] 生产过程

[0464] 图 1 显示了用于生产 M118-REH 的流程示意图。简要而言, 在流程中的第一步, 使用乙酸钙的乙醇水溶液对商购的普通肝素 USP (UFH) 进行系列逐步沉淀 (乙酸钙 /UFH 质量比为 3 : 1), 从而提取出低分子量 UFH 的部分 (也被称为基本是快速移动组分的部分)。步骤 1 分离所得的产物被称为中间产物 1。

[0465] 步骤 2 包括在 pH 7.2 和 37°C 下, 在乙酸钠水缓冲液中使用经修饰的肝素酶 III 消化中间产物 1, 以产生中间产物 2, 其中经修饰的肝素酶 III 具有组氨酸至丙氨酸的第 225 位氨基酸残基取代 (M011)。M011 通过 N-乙酰氨基葡萄糖残基和低硫酸酯化糖醛酸间的 β -消除进行切割以产生在非还原末端具有 Δ 4,5 糖醛酸基团, 在还原末端具有 N-乙酰葡萄糖胺的链。降解完成时, 停止加热并加入氯化钠至约 2% w/v 的溶液终浓度。

[0466] 在步骤 3 中, 使用体积排阻色谱 (SEC) 使中间产物 2 的高抗 Xa 因子活性和抗 II 因子活性组分与低活性组分分离。此步骤的产物称为中间产物 3。

[0467] 在步骤 4 中, 将单个或组合的中间产物 3 物质溶于纯化水中, 通过 0.2 μ m 滤器过滤, 并冻干产生 M118-REH 原料药。

[0468] 生产 M118-REH 的起始原料

[0469] 起始原料的详述

[0470] 用于制备 M118-REH 的起始原料 UFH 钠 (USP) 来自猪肠粘膜。除 USP 试验外, 还使用了其它检验。这些检验列出于表 1 中:

[0471] 表 1 :除 DMF 之外的 UFH 试验和规格

[0472]

试验	规格
效力分析证明	NLT 160U/mg (折干计算)
琼脂糖凝胶电泳	报告快速移动肝素和慢移动肝素 报告硫酸皮肤素和硫酸软骨素

[0473] 基于其电泳迁移性, 琼脂糖凝胶电泳半定量地分离基于肝素的多种组分, 例如硫酸皮肤素和硫酸软骨素。先后在 pH 5.8 的乙酸钡缓冲液和 pH9 的 1,3-丙二胺乙酸酯缓冲液中进行 0.5% 琼脂糖凝胶的水平分离。在所使用的专用电泳槽中, 用不溶于水的低密度有机溶剂 (例如石油醚或庚烷) 覆盖包含液体缓冲剂的电极室。这一设计可在琼脂糖凝胶板和填充有冰的金属冷却盘之间提供有效的热传递。

[0474] 低分子量肝素通常由 USP 级 UFH 制备。为了获得较高效力的低分子量肝素原料药, 将用于 M118-REH 过程的 UFH 起始原料限定为效力高于 160IU/mg 的那些原料。为了控制硫酸皮肤素和硫酸软骨素的水平, 在 UFH 起始原料中测定所述水平并在 M118-REH 生产过程的

第一步进行控制。

[0475] 中间产物的结构分析

[0476] 上文简要说明了 M118-REH 生产过程的步骤（如图 1 所示）。用于糖结构研究的表征技术提供了对此过程各个步骤中 UFH 发生变化的结构属性的理解。此类信息有利于所述过程的控制和再现性，包括对起始原料的选择。

[0477] 使用 2D-NMR (HSQC) 分析和毛细管电泳对步骤 2 的不同原料（或中间产物 1 样品）和制备步骤 2 原料的起始原料 UFH 进行分析。

[0478] 鉴定组成起始原料和中间产物的构建单元，并进行定量。试验中，所研究的步骤 2 的一些物质并非下一步骤（酶消化）的理想底物，鉴定其属性以找出优选的步骤 2 物质。

[0479] 表 2 和表 3 显示的 2D NMR 分析数据说明起始 UFH 和步骤 2 的物质之间的差别。此分析可确定 M118-REH 生产过程的第一步中结构属性方面的所有差异。基于差异分析获得的所有数据，得出了关于起始原料、中间产物和生产过程的某些结论。

[0480] 表 2：对 UFH 和由 UFH 获得的步骤 2 的物质的 2D NMR 分析。这些物质代表优选的步骤 2 物质

[0481]

单糖	UFH #1	步骤 2		UFH #2	步骤 2 #3
		#1	#2		
葡糖胺					
H _{NS} -(I _{2S})	63.7	57	57.1	65.6	56.3
H _{NS} -(I)	9	11.1	12.3.	7.4	12.3.
H _{NS} -(G)	7.7	12.7	11.2	8.9	11.8
H _{NAC} (内在)	12.1	13.9	14.6	11.1	13.3
H _{NS,3S}	6.1	4.4	4.8	7	5.5
H _{6S}	78.2	85.3	85.8	82.5	86.7
连接区域(L.R.)	4.2	3.6	3.8	2.1	1.8
ΔU	0	0	0	0	0
I _{2S}	73	66.8	70.9	75.9	70.2
I-(H _{NS/Ac,6S})	8.1	11.8	9.4	7.2	8.5
I-(H _{NS/Ac})	1.4	2	1.4	0.8	1.1
G-(H _{NS})	8.1	11.2	8.4	8	9.6
G-(H _{NS,3S})	2.8	2.8	3.2	2.7	3.7
G-(H _{NAC})	6.5	5.3	6.6	5.3	4.6
环氧化物	0	0	0	0	0.6

[0482] 与起始原料相比,步骤 2 的物质具有相对较低的 I_{2S} 含量,这一点也通过表中显示的 $H_{NS}-(I_{2S})$ 结构的减少得到反映。和预期的一样,这还伴随着 $H_{NS}-(I)$ 和 $H_{NS}-(G)$ 的增加。有趣的是,6-0-硫酸酯化己糖胺 (H_{6S}) 的量也有相对增加。

[0483] 表 3:对 UFH 和由 UFH 获得的步骤 2 的物质的 2D NMR 分析。这些物质代表优选的步骤 2 物质。

[0484]

单糖	UFH#1	步骤 2#1	UFH#2	步骤 2#2
葡糖胺				
$H_{NS}-(I_{2S})$	68.1	63	66.6	61.8
$H_{NS}-(I)$	6.3	10.7	8.6	11.9
$H_{NS}-(G)$	8.5	12.7	9.5	11.1
$H_{NAC}(\text{内在})$	11.2	8.3	9.8	8.1
$H_{NS,3S}$	5.9	5.3	5.4	6.8
H_{6S}	82.2	89.2	84.7	88.4
连接区域 (L. R.)	2.1	1.5	1.8	1.1
ΔU	0	0	0	0
I_{2S}	76.8	71.3	76.1	69.8
$I-(H_{NS/AC,6S})$	6.7	6.3	6.2	7.1
$I-(H_{NS/AC})$	0.6	0.8	2	1.6
$G-(H_{NS})$	7.2	10	6.6	10.3
$G-(H_{NS,3S})$	1.6	2.3	3.7	3
$G-(H_{NAC})$	4.3	2.4	3.6	2.1
环氧化物	2.8	3.6	1.8	2.4

[0485] “优选”的步骤 2 物质是在所述过程中可作为下一步 (即 M011 的酶消化) 的优良底物的物质,而“较不优选”的步骤 2 物质是较差的底物。在对 $H_{NAC}(\text{内在})$ 的相对含量进行比较时,发现经过步骤 1 之后实际 H_{NAC} 含量在“优选”的步骤 2 物质中增加,而在“较不优选”的步骤 2 物质中减少 (参见表 2 和表 3)。另一个发现是,与“优选”的步骤 2 物质相比,“较不优选”的步骤 2 物质中 $G-(H_{NAC})$ 单位相对量的减少程度大很多。这些发现得到了 M011 底物特异性的证明,其中 M011 优选作用于与未硫酸酯化葡糖酸相邻的连接 (即 $H_{NAC}-G$)。

[0486] 通过这些分析,鉴定出在生产过程的步骤 1 (沉淀) 中从普通肝素到步骤 2 物质发生的结构属性变化。由于步骤 2 物质中的 N-乙酰基含量似乎对随后的酶消化步骤非常重要,人们期望使用具有高 N-乙酰基含量的起始 UFH,从而可更好地在沉淀后生产步骤 2 物质。因此,基于此分析确定的起始 UFH 的预先标准可更好地控制和评估 M118-REH 生产过程。

[0487] 表 4 显示了对过程中间产物的其它试验和规格,并在下文进行详述。

[0488] 表 4:中间产物的试验和规格

[0489]

中间产物	试验	规格
1	琼脂糖凝胶电泳: 硫酸皮肤素和硫酸软骨素低于检测极限	硫酸皮肤素和硫酸软骨素低于检测极限
2	自动显色试验	
2	SEC-MALS	
3	自动显色试验	抗 Xa 因子 NLT130 IU/mg
	自动显色试验	
	SEC-MALS	摩尔质量 5000-9000Da 多分散性 (PD): NMT 1.5

[0490] 琼脂糖凝胶电泳过程已在上文进行描述。

[0491] 如本文所述测定抗 Xa 因子活性。可使用 **Stachrom**[®] 肝素测试试剂盒在 Diagnostica Stago 分析仪, 或使用 Chromogenix 的 **Coatest**[®] 肝素试剂盒在 ACLFutura[™] 凝血系统上, 或在任意等价系统上测定抗 Xa 因子活性。使用低分子量肝素 (批次 01/608 或现有批次) 的 NIBSC 国际标准校正分析仪的反应。使用平行试验的统计方法计算每毫克 M118-REH 原料药的效力 (以国际单位计的抗 Xa 活性)。

[0492] 使用以下原则, 根据本文所述测定抗 IIa 因子活性。可使用 Chromogenix 的试剂 (S-2238 底物, 凝血酶 (53nkat/瓶) 和抗凝血酶) 在 Diagnostica Stago 分析仪或 ACL Futura[™] 凝血系统上, 或在任意等价系统上测定抗 IIa 因子活性。使用低分子量肝素 (批次 01/608 或等价物) 的第二国际标准校正分析仪的反应。使用平行试验的统计方法计算每毫克的 M118-REH 原料药的效力 (以国际单位计的抗 IIa 活性)。

[0493] 使用连接有 Wyatt miniDAWN 多角度光散射 (MALS) 检测器或任意其它适合的 MALS 检测器的体积排阻色谱 (SEC) 系统, 以及 Optilab rEX 干涉折射计 (RID) 或依照 USP 的其它适合 RID<621> (当前版本) 测定 M118-REH 中间产物的重均摩尔质量、多分散性和摩尔质量分布。SEC 柱由使用高分辨率 L20 作为填料的一些柱子组成, 例如 Tosoh SWXL 保护柱与串联偶联的 Tosoh TSKgel G3000SWXL 和 Tosoh TSKgel G2000SWXL。使用 0.2M 硫酸钠流动相 (使用硫酸将 pH 调整至 5.0) 以 0.5mL/min 平衡所述系统。在流动相中添加 0.05% 的叠氮化钠。在注射 M118-REH 中间产物前将其溶于所述流动相从而获得 10mg/mL 的溶液。使用 Wyatt Astra 软件或任意适合的软件测定重均摩尔质量、多分散性和分布参数。分布利用以下参数表征: 摩尔质量小于 5,500Da (M_{5500}) 的链的百分比和摩尔质量大于 8,000Da (M_{8000}) 的链的百分比或摩尔质量小于 5,500Da (M_{5500}) 的链的百分比和摩尔质量大于 7,500Da (M_{8000}) 的链的百分比。

[0494] 在 M118-REH 过程的第二步中, 使用 M011 酶消化中间产物 1。随着中间产物 1 底物的酶降解而产生的包含 $\Delta 4,5$ 糖醛酸残基的中间产物 2 具有 UV₂₃₂ 吸收的特征。为了监测消化的进展, 定期对反应溶液进行取样, 并测定 232nm 的吸收。232nm 的吸收在 1 小时内的改变不超过 2AU 时, 可认为完成步骤 2 的消化。

[0495] 表 5 显示多种 M118-REH 制剂的重均分子量和 M118-REH 各种制剂的分子量分布。表 6 显示 M118-REH、LMWH 和 UFH 产物的比较。

[0496] 表 5 :5 个不同批次 M118-REH 的分子量、多分散性和链长度特征

[0497] 批次 #	Mw (Da)	PD	M5500	M8000	n
[0498] 1	7250	1.1	24.6%	31.9%	13
[0499] 2	7300	1.1	26.4%	33.0%	13
[0500] 3	7500	1.1	24.6%	35.0%	13
[0501] 4	6350	1.1	38.6%	17.7%	12
[0502] 5	6450	1.1	40.6%	20.7%	12

[0503] * 由 M118-REH 原料测定的 dn/dc 计算 MW。

[0504] 表 6 :M118-REH、LMWH 和 UFH 产物的比较

[0505]

属性	M118-REH ¹	Lovenox ²	UFH ³
抗 Xa 活性 (IU/mg)	228	100	150
抗 IIa 活性 (IU/mg)	155	25	150
抗 Xa/ 抗 IIa 比值	1.5 : 1	4 : 1	1 : 1
平均分子量	6,350	4,500	12,000
多分散性	1.1	1.3	1.6
皮下生物利用度	有	有	无
使用鱼精蛋白的可逆性	完全	部分	完全
ACT/aPPT 的可监测性	是	否	是

[0506] ¹*用于 M118-REH 药物产物制剂的批次的值；由文献中的 UFH 数据估算的 dn/dc 处理而得的平均 MW

[0507] ²Lovenox 的药品说明书

[0508] ³关于 USP 肝素的论著

[0509] M118-REH 的结构表征 :M118-REH 结构特征的鉴定

[0510] 现已研发出的表征 M118-REH 的方法包括提供互补数据群的多种不同的分析技术。

[0511] 本文提供了对 M118-REH 的表征,从而可以理解与其它 LMWH 相比时, M118-REH 的独特之处。对来自这些表征技术的结果的总结有助于说明 M118-REH 为独特的混合物。

[0512] 使用一系列分析技术完成对普通肝素 (UFH) 和 LMWH 产物的表征,使用所述分析技术已鉴定出给定 LMWH 的独特化学结构,在多个不同 LMWH 中以不同量出现的结构,以及负责肝素生物性质的结构。

[0513] 对如 M118-REH 的复合 LMWH 混合物的分析不仅需要说明由肝素生物合成产生的内在结构可变性,还要说明在酶切和生产过程中产生的结构。这可以通过对混合物中存在的天然和经修饰(如果存在)的还原和非还原末端特点进行分辨而得到解决。此时,还需要确认由亲本 UFH 分子确定的二糖单位相对“顺序”没有受到生产过程的影响。因此,有必要提供在 M118-REH 链中这些经修饰或天然构建单元存在的序列。为了说明这些因素,现已研发出表征 M118-REH 的方法,该方法包括使用来自于可提供独特的互补数据群的多种不同分析技术的数据。

[0514] 使用 CE 进行成分分析以鉴定 M118-REH 链中包含的单个构建单元,并对其进行定量。这些方法还能鉴定负责抗 Xa 活性的构建单元结构,称为“抗 Xa 构建单元”。

[0515] 构建单元分析 / 成分分析

[0516] 通过毛细管电泳 (CE) 进行的成分分析

[0517] 简而言之,此方法包括将 M118-REH 酶促消化成其成分构建单元,随后使用 CE 进行分离(图 2A 和图 2B)。

[0518] CE 是一种高分辨率的分离技术,并且已经广泛用于 UFH 和其它葡胺聚糖的分析。本文的方法使用无涂层熔融硅毛细管内的毛细管区带电泳。利用毛细管电泳,硫酸酯化程度最高的物质在毛细管中移动最快,并首先被检测到。

[0519] 代表性数据

[0520] 图 2 显示通过 CE 观察到 M118-REH 的酶消化图谱。特别地,在 M118-REH 中没有观察到除已存在于 UFH 中的修饰构建单元之外的修饰构建单元(通过对依诺肝素 1,6-结构的观察表明)。另一个有趣的发现是与依诺肝素相比,M118-REH 中 3-O-硫酸酯化物质的量

几乎增加了一倍（通过 AT-III tetra 峰表明）。这与混合物中观察到的较高抗 Xa 活性良好地相关，并且与 M118-REH 的生产方法一致。基于此技术显示 M118-REH 的硫酸酯化总程度也略高于依诺肝素。

[0521] 此技术也用于测定 M118-REH 中每个糖构建单元成分的存在和数量（表 12）。

[0522] 表 7：在 M118-REH 的 CE 分析中观察到的糖构建单元

[0523]

峰	结构
1	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$
2	$\Delta U_{2S}H_{NS}$
3	$\Delta UH_{NS,6S}$
4	$\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$
5	ΔUH_{NS}
6	$\Delta U_{2S}H_{NAc}$
7	$\Delta UH_{NAc,6S}$
8	ΔUH_{NAc}
9	$\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$
10	$\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$
11	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}$
12	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$
13	$\Delta U_{ga1}H_{NS,6S}$
14	$\Delta U_{ga1}H_{NS}$

[0524] 定性分析上，没有在 M118-REH 图谱中观察到 1,6- 脱水构建单元（在依诺肝素中观察到）或 2,5- 脱水结构（在达肝素中发现）。一些有趣的发现来自于对这些结构的定量分析。在对依诺肝素和 M118-REH 中峰 10 ($\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$) 的相对摩尔%进行比较时，M118-REH 中存在的峰值较高，证明 M118-REH 生产过程富集了肝素中的活性抗凝序列。与依诺肝素相比，M118-REH 中的三糖 ($\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}$) 含量相对较低。这是对生产过程的反映。用于制备依诺肝素的化学过程导致寡糖还原末端的“剥离”，从而增加了奇数链的数量。对于 M118-REH 则不是这种情况，因此三糖水平仍是在起始 UFH 观察到的直接结果。这一分析表明 CE 法的灵敏度足以获得对 LMWH 生产中使用的不同过程的指示性变化，因此可具有高分辨率。

[0525] 表 8：M118-REH 和依诺肝素中选定结构的定量比较

[0526]

结构	M118	依诺肝素
$\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$	8.6	4.7
$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}$	0.6	1.9

[0527] 通过 2D NMR 进行的成分分析

[0528] 现已成功地将 NMR 谱用于检测和定量与多糖中主要和次要结构特征相关的信号。NMR 谱也是能够有效测定混合物中艾杜糖醛酸和葡萄糖醛酸的适合技术之一。现已将二维 (2D) NMR 谱用作为拆分和鉴定对应于特定单糖残基群的特征信号的手段。这一方法不仅能够定量混合物中的基本单糖成分，而且能够以定量的方式评估其连接环境。

[0529] 二维 NMR 为通过 CE 的 M118-REH 成分分析提供了互补技术。2D NMR 提供关于 H-U 连接的二糖的信息，从而提供了二糖连接的互补分析。近期使用 2D 质子-碳相关谱 (HSQC) 试验的方法已经证明其获得葡胺聚糖的此类定量成分分析的能力。

[0530] 图 4 显示使用 2D 质子-碳相关谱 (HSQC) 测定的 M118-REH 中异头区域的图谱。图

中显示了异头区域的交叉峰。

[0531] 对 M118-REH 中异头区域的分析提供了一些关于使 M118-REH 具有不同于其它 LMWH 的独特性的非常有趣的信息。第一,与其它如依诺肝素的 LMWH 相比, M118-REH 的异头区域要简单很多。第二,在分析链的还原末端残基时,发现大部分链的末端为 N-乙酰葡萄糖胺,仅有少量链的末端为 N-磺基葡萄糖胺。这是用来制备 M118-REH 的酶的特异性的结果。第三, NMR 数据表明约 30% 的链在非还原末端具有 Δ U 残基,这也是酶特异性的结果。第四,在 M118-REH 中没有观察到 G-H_{NAC} 二糖。最后,在 NMR 谱中没有观察到连接区域的糖类。表 7 列出了 M118-REH 中单糖成分的百分数及其连接环境。NMR 还能够确定 M118-REH 的艾杜糖醛酸 / 葡萄糖醛酸比值。

[0532] 表 9 :M-118 中葡萄糖胺和糖醛酸残基成分的百分数 (两个试验的结果)

[0533]

M118-REH

葡糖胺	
H _{NS} -(I _{2S})	57.6/57.0
H _{NS} -(I)	9.8/12.0
H _{NS} -(G)	11.0/11.1
H _{NAC} (内在)	6.1/3.1
H _{NS,3S}	7.3/7.2
H _{NSred}	1.6/1.5
H _{NAC} αredox	4.6/5.1
H _{NAC} βredox	2.0/3.0
H _{6S}	90.4/90.5
L.R.	0/<0.1

糖醛酸	
ΔU	1.9/2.4
I _{2S}	68.7/70.20
I-(H _{NS/Ac,6S})	9.9/9.5
I-(H _{NS/Ac})	1.4/0.9
G-(H _{NS})	8.7/7.7
G-(H _{NS,3S})	5.9/4.8
G-(H _{NAC})	0/0
GalA	2.7

环氧化物 0.8

[0534] 结论

[0535] M118-REH 的结构属性鉴定如下：

[0536] •基于相对摩尔%，与现有 LMWH 和 UFH 起始原料相比，M118-REH 富含具有 3-0- 硫酸酯的糖链（AT-III 结合四糖）；

[0537] •产生突出的还原末端结构（H_{NAC}）；

[0538] •唯一发现的经修饰的非还原末端结构为 ΔU；

[0539] • 保持了 UFH 的天然二糖骨架结构,并有限地引入了在其它 LMWH 观察到的与加工相关的变化;

[0540] • 从混合物中除去抗 Xa 或抗 IIa(凝血酶)结合不需要的 UFH 成分,从而产生特征更加明确的肝素;

[0541] • M118-REH 解聚过程的特异性保留了所需的链长度以及最接近于结合位点的分离,从而保持抗 IIa 活性。

[0542] 如图 5 所示,LMWH 产物的关键属性是通过多种解聚方法将较长的多糖链切割成较小的片段。此切割事件可由化学或酶反应引发,并在分子的还原和非还原末端产生特征性标记。下文描述了 M118-REH 中存在的特征性末端基团。

[0543] 非还原末端结构

[0544] 导致新的非还原末端(缩写为 AU)形成的酶切特异性提供了在多糖链中设置 AT-III 结合位点的方法。

[0545] 还原末端结构

[0546] M118-REH 链上新还原末端的葡糖胺结构是对所述过程中使用的酶的特异性的反映。因此,M118-REH 中的大部分还原末端结构为 N-乙酰化己糖胺(H_{NAC})残基。

[0547] M118-REH 和普通肝素之间的结构差别

[0548] 1) 与普通肝素(UFH)原料相比,M118-REH 具有更高摩尔%的抗凝血酶结合糖序列。

[0549] 2) 与 UFH 原料相比,M118-REH 具有的连结区域的量可以忽略不计。

[0550] 3) M118-REH 在链的非还原末端具有特定比例的 $\Delta 4,5$ -葡萄糖醛酸,而 UFH 在非还原末端不含这种修饰残基。

[0551] 总之,M118-REH 是一种具有独特物理和功能属性的肝素产物。

[0552] 以上讨论的大多数结构属性都是用于制备 M118-REH 的酶的性质直接结果。这些包括显著的还原末端结构(H_{NAC})、唯一的经修饰非还原末端结构(ΔU)以及连结区域的除去。此外,由于酶优选切割肝素混合物中的低级或非硫酸酯化域而并不影响 AT-III 结合序列,因此可使其在 M118-REH 中富集。

[0553] 使用上述表征方案分析了 4 个批次的 M118-REH。此分析确认了所述 M118-REH 生产的一致性

[0554] 表 10 :多个批次 M118-REH 的 CE 分析

[0555]

峰	结构	#1	#2	#3	#4
1	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$	57.1	59.5	57.0	57.4
2	$\Delta U_{2S}H_{NS}$	6.0	5.6	5.4	6.1
3	$\Delta UH_{NS,6S}$	13.2	12.3	12.2	12.7
4	$\Delta U_{2S}H_{NAC,6S}$	1.8	1.6	1.7	1.8
5	ΔUH_{NS}	0.6	0.7	0.6	0.7
6	$\Delta U_{2S}H_{NAC}$	0.5	0.5	0.4	0.4
7	$\Delta UH_{NAC,6S}$	4.5	3.7	3.7	4.3
8	ΔUH_{NAC}	1.8	1.3	1.5	1.8
9	$\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$	1.3	1.0	1.2	1.2
10	$\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$	10.4	9.4	8.9	8.6
11	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}$	0.3	0.3	0.7	0.6
12	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$	0.5	0.7	1.0	0.9
13	$\Delta U_{gal}H_{NS,6S}$	1.7	2.9	4.4	3.0
14	$\Delta U_{gal}H_{NS}$	0.2	0.5	0.9	0.4

[0556] 表 10A :峰的优选范围

[0557]

峰	结构	A
1	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$	58 ± 5
2	$\Delta U_{2S}H_{NS}$	6 ± 2.5
3	$\Delta UH_{NS,6S}$	13 ± 3
4	$\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$	1.5 ± 1.5
5	ΔUH_{NS}	$0.6+1.0$
6	$\Delta U_{2S}H_{NAc}$	$0.5+1.0$
7	$\Delta UH_{NAc,6S}$	$4+2$
8	ΔUH_{NAc}	$1.5+2.0$
9	$\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$	1.2 ± 1.5
10	$\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$	9.5 ± 4
11	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}$	0.5 ± 1.0
12	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$	0.7 ± 2.0
13	$\Delta U_{gal}H_{NS,6S}$	3.0 ± 3.0
14	$\Delta U_{gal}H_{NS}$	0.6 ± 1.5

[0558] 表 11 :M118-REH 葡糖胺和糖醛酸残基成分的百分比

[0559]

单糖	1	2	3	4
葡糖胺				
H _{NS} -(I _{2S})	54.3	57.0	61.8	57.6
H _{NS} -(I)	12.5	12.0	11.0	9.8
H _{NS} -(G)	10.8	11.1	9.5	11.0
H _{NAC} (内在)	3.4	3.1	4.2	6.1
H _{NS,3S}	8.7	7.2	7.0	7.3
H _{NSred}	0.8	1.5	0.4	1.6
H _{NAC} αredox	6.0	5.1	4.1	4.6
H _{NAC} βredox	3.6	3.0	2.0	2.0
H _{6S}	90.0	90.5	91.3	90.4
连接区域	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
糖醛酸				
ΔU	2.7	2.4	2.1	1.9
I _{2S}	69.8	70.2	70.6	68.7
I-(H _{NS/Ac,6S})	11.8	9.5	9.2	9.9
I-(H _{NS/Ac})	1.4	0.9	1.2	1.4
G-(H _{NS})	8.9	7.7	8.4	8.7
G-(H _{NS,3S})	5.4	4.8	4.1	5.9
G-(H _{NAC})	0	0	0	0
半乳糖醛酸	0	2.1	2.4	2.7
环氧化物	0	2.4	2.0	0.8

[0560] 表 11A : 优选的结构范围

[0561]

单糖	A
葡糖胺	
H _{NS} -(I _{2S})	57.7 ± 7
H _{NS} -(I)	11.3 ± 5
H _{NS} -(G)	10.6 ± 5
H _{NAc} (内在)	4.2 ± 5
H _{NS,3S}	7.6 ± 5
H _{NSred}	1.1 ± 5
H _{NAc} aredox	5.0 ± 5
H _{NAc} βredox	2.7 ± 5
H _{6S}	90.6 ± 6
连接区域	<0.1-0.0
糖醛酸	
ΔU	2.3 ± 5
I _{2S}	69.8 ± 6
I-(H _{NS/Ac,6S})	10.1 ± 6
I-(H _{NS/Ac})	1.2 ± 5
G-(H _{NS})	8.4 ± 5
G-(H _{NS,3S})	5.1 ± 5
G-(H _{NAc})	0 + 2
半乳糖醛酸	1.8 ± 5
环氧化物	1.3 ± 5

[0562] 药物产物 M118-REH 注射剂的规格和成分

[0563] 药物产物 M118-REH 注射剂为 I 型玻璃瓶装 3mL 单次使用的澄清无色至微黄溶液，由氯化丁基橡胶塞密封并使用铝质钳口盖进行外封。每瓶标定包含 2mL 5000 IU 抗 Xa 因子活性。

[0564] 表 11 给出了 M118-REH 注射剂的定量成分。所给出的是标签为 2mL 体积中的成分。瓶中的填充量为 2.15mL，与 USP 推荐的过量体积一致。

[0565] 表 12 :M118-REH 注射剂成分

[0566]

成分	每单位（瓶）的量	功能	质量标准
M118-REH 原料药	5000IU 抗 X 活性 ¹	活性药物成分	N/A
氯化钠	过程渗透度调节 ²	渗透调节剂	USP
注射用水	定容至 2mL	溶剂	USP

[0567] ¹ 根据抗 Xa 因子活性（折干计算）和干燥损失来计算 M118-REH 原料药的量。假定对于 200IU/mg 的抗 Xa 因子活性，M118-REH 原料药的量为每瓶 25mg。

[0568] ² 达到 280-330 mOsm/L 渗透压所需要的氯化钠的量为约 8mg/mL，或每瓶 16mg。

[0569] M118-REH 注射剂中不需要使用稀释剂。

[0570] M118-REH 注射剂的成分

[0571] 通过将 M118-REH 原料药溶于注射用水来生产 M118-REH 注射剂。M118-REH 原料药极易溶于水溶液，因此原料药的粒径分布对药物产物的性质没有影响。

[0572] 氯化钠 (USP) 是 M118-REH 注射剂中唯一使用的赋形剂（浓度为约 8bg/mL）。使用氯化钠作为渗透度调节剂以避免施用注射位点的不适和红血球溶解。

[0573] M118-REH 注射剂生产过程

[0574] M118-REH 注射剂的生产过程由将 M118-REH 原料药溶于注射用水 (USP)，和使用氯化钠 (USP) 调节渗透度组成。将配制的溶液通过两个串联的 0.2µm 滤器进行过滤，并在无菌条件下装瓶。肝素钠产物在极高温下会发生降解，因此不能进行最终灭菌。图 6 显示了 M118-REH 注射剂的加工流程图（见下文）。

[0575] 图 6 显示了 M118-REH 注射剂的加工流程图。根据以下等式，由试验（抗 Xa 因子活性）和化验证证书的干燥损失计算各批次中应添加的 M118-REH 原料药的量：

[0576] $2500\text{IU/mL} / \text{试验 (IU/mg)} \times 100 / (100 - \text{干燥损失}\%) \times \text{批次体积 (mL)} \div 1000\text{mg/g}$
= 应添的加原料药的量

[0577] 向配制容器中添加约等于批次最终重量 75% 的注射用水，并开始搅拌。向所述容器中缓慢添加计算量的 M118-REH 原料药，并混合直至所有固体溶解。加入初始量的氯化钠 (USP)，并将溶液混合直至所有固体溶解。加入注射用水直至最终批次体积，并将溶液继续混合 5 ~ 15 分钟。测定渗透度，并根据需要添加额外的氯化钠 (USP) 以达到 280-330mOsm/L 的渗透度。

[0578] 使用经预先灭菌的两个串联的 Millipak 20 PVDF（聚偏氟乙烯）0.22µm 滤器对大批 M118-REH 药物产物进行灭菌。将产物过滤至灌装容器中，并在过滤结束时检测滤器的完整性。

[0579] M118-REH 的生物和药理学性质

[0580] M118-REH 是产生解聚化低分子量肝素的酶促消化的产物。解聚化混合物富含活性抗凝剂和抗血栓形成片段，这可能是特异性葡胺聚糖裂解酶的位点特异性酶切的结果。所述特异性位点和通过这种酶进行的定位解聚能够使 M118-REH 成为一种高效的动脉损伤保护分子。此外，M118-REH 还具有可逆且容易地通过床边凝结试验检测的属性。

[0581] 现已完成关于 M118-REH 药理和生物学性质的研究，此研究过程揭示了 M118-REH 的体外和体内作用模式。已经对抗凝和抗血栓形成功能的机制进行了研究。这些研究还提出了初步的构效关系 (SAR)。下文描述的这些研究及其结果是对产生的 M118-REH 生物药理活性图谱的初步分析。

[0582] 凝血活性的体外分析：

[0583] 根据第二国际低分子量肝素标准, M118-REH 的体外抗 Xa 活性的范围是 180 ~ 300IU/mg。M118-REH 制剂较高的体外抗 Xa/IIa 活性与其包含 3-O- 硫酸酯化部分的 ΔUH_{NAC} , $_{6S}GH_{NS,3S,6S}$ 片段成比例。

[0584] 根据第二国际低分子量肝素标准, M118-REH 的体外抗 IIa 活性范围是 100 ~ 250IU/mg。

[0585] 2.4 μ g/mL 的 M118-REH 可将体外 aPTT 由 40 秒延长至 80 秒, 并且 aPTT 的变化与抗 Xa 和抗 IIa 活性成比例。

[0586] 硫酸鱼精蛋白体外中和抗 Xa 活性的测定:

[0587] 鱼精蛋白能够以 1mg : 100IU 人血浆抗 Xa 活性的比例完全逆转 M118-REH 的抗 Xa 活性。可将这一点与其它 LMWH 制剂进行比较。例如, 以 3mg : 100IU 人血浆抗 Xa 活性的比例, 鱼精蛋白仅能中和伊诺肝素 60% 的抗 Xa 活性。这些结果显示于图 7 中。

[0588] 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 释放组织因子途径抑制物 (TFPI):

[0589] 在不含 ECGS 的 2% FBS F12K 改良培养基中培养得自于 ATCC 的 HUVEC。在相同的培养基中以 0.01mg/ml 和 0.005mg/ml 的终浓度配制 M118-REH、Lovenox 和 UFH。将每组各 3 孔的细胞在 37°C、5% CO₂ 和 95% O₂ 的条件下温育 24 和 48 小时。取上清液, 使用来自 ADI 的 ELISA 试剂盒进行 TFPI 释放试验。

[0590] 如图 8 所示, 24 和 48 小时后, 0.005mg/ml 和 0.01mg/ml 的 M118-REH 显著增加了 HUVEC 的 TFPI 释放。与普通肝素相比, M118-REH 导致 HUVEC 更多地向细胞培养基中释放 TFPI。与对照相比, Lovenox 没有导致 TFPI 释放的显著增加。

[0591] M118-REH 的体内药物代谢动力学:

[0592] 在啮齿动物模型 (例如 Sprague-Dawley 大鼠和 B16B16 小鼠模型) 中, M118-REH 在静脉注射后具有比 UFH 长的消除半衰期, 且与依诺肝素的消除半衰期相当。M118-REH 在皮下注射后被快速吸收, 其 T_{max} 的范围是 1 ~ 3 小时。

[0593] 在如新西兰白兔的兔模型中, 皮下注射 M118-REH 获得高于 UFH 的生物利用度 (以抗 Xa 和抗 II 活性计), 其生物利用度为静脉注射的 50% ~ 100%。M118-REH 的体内药物代谢动力学与依诺肝素相当, 其消除半衰期范围是 3 ~ 5 小时, 且主要消除机制是通过肾排泄。

[0594] 表 13 :M118-REH、依诺肝素和 UFH 在经静脉注射到兔和大鼠模型后的药物代谢动力学参数。

[0595]

		M118-REH	依诺肝素	UFH
兔静脉注射 1.5mg/kg	T1/2 (小时) 抗 Xa 活性	0.87 ± 0.25	1.93 ± 0.45	0.54 ± 0.03
	抗 IIa 活性	0.85 ± 0.05	1.78 ± 0.63	0.89 ± 0.05
大鼠静脉注射 抗 Xa	T1/2 (小时) 1 mg/kg	0.39 ± 0.06	0.41 ± 0.07	0.35 ± 0.06
	0.5 mg/kg	0.29 ± 0.12	N/A	0.19 ± 0.04

[0596] 在非人类灵长动物 (NHP, 例如猕猴) 中, M118-REH 的消除半衰期范围是 20 分钟至 50 分钟。静脉注射后的抗 Xa/IIa 比值在 0.5 ~ 2 的药物代谢动力 (PK) 过程中保持一致, 并且根据对药物代谢动力学参数的分析, M118-REH 分布于循环系统中并通过肾途径消除。表 14 显示了 M118-REH 在 NHP 模型中的药物代谢动力学。

[0597] 表 14 :M118-REH 在 NHP 模型中的药物代谢动力学

[0598]

测试材料	组		剂量 (IU/kg)	Rsq	t1/2 (小时)	Cmax (IU/mL)	AUCINF_obs (hr*IU/ML)	Vz_obs (mL/kg)	Cl_obs (mL/hr/kg)
Anti-Xa	1	平均	150.0	98	0.50	4.07	4.07	27.26	37.24
		SD	0.9	0.02	0.04	0.15	0.54	5.57	4.65
Anti-IIa	2	平均	150	1.0	0.68	2.733	3.45	43.17	43.92
		SD	0.0	0.01	0.05	0.38	0.45	3.66	5.38

[0599] M118-REH 的药物代谢动力学表现为一级消除。

[0600] 施用 M118-REH 后,可在 24 小时期间维持高水平的体内 TFPI 浓度。ACT 和 aPTT 均与抗 Xa 活性良好相关。

[0601] M118-REH 的体内药效动力学试验:

[0602] 在如 Sprague-Dawley 大鼠的啮齿动物模型中,通过颈静脉注射 1mg/kg 或 2mg/kg 的 M118-REH 和 UFH,而依诺肝素的剂量为 0.5mg/kg 或 1 mg/kg。使用 Hemochron Jr 测定 ACT (活化凝血时间)。在此模型中,活化部分凝血活酶时间 (aPTT) 和活化凝血时间表现出对 M118-REH 剂量增加的剂量响应。以 0.5mg/kg 静脉注射 M118-REH 给药后 ACT 增加了 1.5 ~ 3 倍,而以 1mg/kg 给药后 ACT 则增加了 2 ~ 4 倍。在抗 Xa/IIa 测定中,药效动力学图谱与药物代谢动力学图谱类似,消除半衰期范围是 0.15 ~ 0.5 小时。

[0603] 在如新西兰白兔的兔模型中,在静脉递送 M118-REH 后测定 aPTT 和 ACT。aPTT 和 ACT 的增加与 M118-REH 的剂量成比例。以 1.5mg/kg 经静脉和皮下施用后,抗 Xa/IIa 比值保持稳定。与 M118-REH 相反,在观察期间,静脉施用后依诺肝素和 UFH 的抗 Xa/IIa 比值发生显著波动。

[0604] 如图 9 所示,在如猕猴的 NHP 模型中,结果显示以 150IU 抗 Xa 活性 /kg 静脉注射 M118-REH 后,aPTT 和 ACT 显著增加了 2 ~ 4 倍和 1.5 ~ 3 倍。

[0605] M118-REH 的静脉浓注使释放到血流中的 TFPI 增加 2 ~ 20 倍,并且此效果维持超过 24 小时。

[0606] 此外,还在通过严重电解损伤诱导的犬深静脉血栓模型中研究了 M118-REH 的静脉浓注后连续输注的效果。下文标题为“电解诱导的比格犬股动脉损伤模型”的实施例提供了关于此试验的更多细节。

[0607] 在临床前期模型中的 M118-REH 功效试验:

[0608] 氯化铁诱导的颈动脉损伤

[0609] M118-REH 和依诺肝素的对比试验获得对闭塞性血栓的剂量依赖性抑制。与盐水相比,剂量为 0.5mg/kg 的 M118-REH 可显著 ($p < 0.05$) 延长形成闭塞的时间 (TTO) (分别为 28.5 ± 7.1 分钟和 11.1 ± 0.9 分钟)。在完整的 60 分钟观察期内,25% (2/8) 的接受 0.5mg/kg M118-REH 注射的受损颈动脉保持通畅。相反,在完整的 60 分钟观察期内,全部 (9/9) 的接受盐水注射的受损颈动脉发生闭塞。施用 1mg/kg 的 M118-REH 可进一步延长

TTO(55.3±3.6 分钟),在 60 分钟观察期的末,83% (10/12) 的血管保持通畅。与用盐水注射的动物相比,施用 2mg/kg、3mg/kg 或 4mg/kg 依诺肝素的所有大鼠均具有显著延长的 TTO(分别为 19.1±1.4 分钟,36.0±5.6 分钟和 40.2±6.3 分钟)。在 60 分钟观察期之内,施用 2mg/kg 剂量依诺肝素的大鼠全部 (7/7) 发生颈动脉闭塞,而施用 3mg/kg 和 4mg/kg 依诺肝素的大鼠中分别有 62% (7/13) 和 55% (6/11) 发生颈动脉闭塞。尽管抗 Xa 活性低于 3mg/kg 和 4mg/kg 剂量的依诺肝素,但 M118-REH(1mg/kg) 产生最大程度的抗血栓保护作用。所述结果显示于图 10 和表 15 中。

[0610] 表 15:功效数据的统计学分析(学生 t 检验)

[0611]

	对照	M118-REH 0.5mg/kg	M118-REH 1mg/kg	依诺肝素钠 2mg/kg	依诺肝素钠 3mg/kg	依诺肝素钠 4 mg/kg
平均 (分钟)	11.3	29.2**	55.3#**	23.2**	36.0**	41.8**
St.Dev.	2.3	16.8	12.6	8.3	20.3	20.6

[0612] * 与对照组相比 $p < 0.05$; ** 与对照组相比 $p < 0.01$; # 与 3mg/kg 依诺肝素钠相比 $p < 0.01$

[0613] 电解诱导的比格犬股动脉损伤模型(Lucchesi 模型):

[0614] 在严重电解损伤诱导的比格犬深动脉血栓模型进行 M118-REH 抗血栓形成和抗凝血作用的试验。

[0615] 手术过程

[0616] 在使用丙泊酚(4~8mg/kg)静脉注射进行麻醉前至少 10~15 分钟,通过肌肉注射硫酸阿托品(0.02mg/kg)和乙酰丙嗪(0.2mg/kg,每只<3mg)对动物进行预处理。插管并通过体积调节式呼吸机吸入异氟烷来维持动物麻醉。

[0617] 在颈的内侧表面制造纵向切口以接近颈动脉上的组织。通过钝器解剖法先后剥离出约 2cm 的一条颈动脉和两条颈静脉(其中一条用作备份),并通过近端和远端结扎进行支撑。制造另外两条起始于腹部并沿耻骨肌延伸覆盖每条腿骨长度 66%-75% 的切口。在各切口处打开筋膜,并将其下的股动脉剥离出约 2~3cm。

[0618] 动物仪器装备(animal instrumentation)

[0619] 穿过左右股动脉壁将血管内电极放置于直接接触内膜的位置,从而对 24 只麻醉比格犬进行仪器装备。各电极均与恒流电源连接,阴极放置于远端皮下位点。立即将狭窄装置(stenotic device)放置在电极远端,将血管外周多普勒血流探针放置在电极近端,并将导管插入颈动脉,所有以上装置均连接到 Gould Ponemah 生理平台(Linton Instrumentation, Norfolk, UK)上以连续监测动脉血压、血流和心率。将第二导管插入颈静脉以收集血液样品。最后,将静脉导管插入外周静脉中用于输注治疗研究,并放置肢体导联以进行心电图(通过导联 II 测定)。

[0620] 股动脉电解损伤模型

[0621] 仪器装备完毕后,使各动物接受 90 分钟连续静脉溶媒(0.9%生理盐水)输注。

输注开始后 15 分钟,通过血管内电极向右股动脉(对照)施加电流(300 μ A),并连续施加直至完整血栓形成(定义为多普勒血流减少至基线值的 $< 2\%$),或者,如果血管保持畅通,则连续施加所述电流直至开始电解损伤后 180 分钟的观察期结束。此后,在电解损伤位点近端和远端进行结扎,获取该片段,并对存在的任何血栓进行称重。

[0622] 在此模型中,富含血小板的血管内血栓在近端造成末梢动脉狭窄。因此,调节狭窄装置以将缺氧诱导的反应性充血限制到物理闭塞反应基线的 $< 80\%$ (在进行溶媒输注或活性剂处理输注前在各股动脉处测定反应性充血基线)。为了保证损伤位点的血液动力学性质接近于通过股动脉的正常血流,通过异氟烷麻醉分别将平均动脉压和心率标定在约 70mm Hg 和每分钟 100 次。

[0623] 在各动物右股动脉完成上述评估血栓形成基线参数试验后,在存在 M118-REH 或 UFH 输注的左股动脉(活性剂处理)进行相同的处理过程。将动物分成 4 个处理组($n = 6$)。3 个处理组分别接受 37.5IU 抗 Xa 活性/kg、75IU 抗 Xa 活性/kg 和 150IU 抗 Xa 活性/kg M118-REH 的静脉浓注,随后以 1.0IU 抗 Xa 活性/kg/分钟连续输注 M118-REH 90 分钟。第四组接受 75U/kg UFH 的静脉浓注,随后以 1.0U/kg/分钟连续输注 UFH 90 分钟。在浓注处理 15 分钟后开始进行连续电损伤,随后进行与溶液对照组相同的分析。

[0624] 在方案指定的时间点(见下)进行皮肤出血时间(CBT)测试和血液收集。在试验全程受到监控的生理参数包括脉搏率、呼吸率、直接血压、直肠温度、潮气量、潮气末二氧化碳水平和 O_2 饱和度。

[0625] 血液学和凝血测定

[0626] 在第 15、30、45、60、75、90、105、120、135、150、165 和 180 分钟收集全血样品(约 100 μ L),测定 ACT 以进行血液学和凝血测定。根据厂商说明,使用 HEMOCHRON® Jr. Signature+ 微量凝血系统(ITC, Edison, NJ, USA)测定 ACT。在第 15 分钟、第 60 分钟和第 180 分钟或发生闭塞时(如果可以)收集两份全血试样(每份约 1.3mL)用于血液学和进一步的凝血试验。根据厂商说明,使用 Advia 120 血液学系统(Bayer Diagnostics Norden, Lyngby, Denmark)测定血液学参数(WBC、RBC、HGB、CHT、MCV、MCH、MCHC、PLT、RTC、ARTC 和 WBC 分类)。根据厂商说明,使用 MLA Electra 1400C 凝血分析仪(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)进行凝血试验(凝血酶原时间 [PT]、活化部分凝血活酶时间 [aPTT] 和纤维蛋白原水平 [FIB])。

[0627] 将处理开始后 0、15 和 60 分钟收集的柠檬酸化全血液样品在冷冻离心机中以 3000g 离心约 10 分钟以测定抗 Xa 因子和抗 IIa 因子水平。收集血浆,在 -20°C 下速冻,并在 -80°C 下冷藏直至用于显色试验。使用 Stachrome 肝素抗 Xa 活性试剂盒(Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, 法国)以及由底物 S2238、牛凝血酶和人抗凝血酶 III(Chromogenix, 意大利米兰)组成的试剂组进行抗 Xa 因子和抗 IIa 因子试验。在 STA-R 分析仪(Diagnostica Stago)中对所有显色试验进行定量,随后通过 Momenta Pharmaceuticals, Inc. 标准操作程序(SOP)进行抗 Xa 因子和抗 IIa 因子活性测试。在第 15 分钟、第 60 分钟和第 180 分钟或发生闭塞时(如果可以)测定 CBT。使用试验工具的 SOP 通过 Mielke 法在前肢进行 CBT 评估。

[0628] 统计分析

[0629] 除非另有说明,所列出的数据为平均值 \pm 标准偏差(SD)。假定不同处理组的方

差相等,使用学生 t 试验比较不同处理组的平均值。通过计算相对于对照的比数比并使用 z 检验产生 P 值来比较处理组间闭塞的发生频率。所有检验的显著性水平定为 0.05。

[0630] 血浆抗 Xa 因子活性和抗 II 因子活性

[0631] 将多种剂量的 M118-REH 与标准剂量的 UFH(75 U/kg) 进行比较。M118-REH 显示出对 Xa 因子和 IIa 因子的剂量依赖性抑制,最大剂量的 M118-REH(150IU/kg) 显示出与 UFH 类似的抗 Xa 因子活性(图 13 和表 16)。对于 M118-REH 和 UFH,抗 II 因子活性均随抗 Xa 因子活性成比例增加,虽然 M118-REH 的相关系数 ($r^2 = 0.890$) 要大于 UFH($r^2 = 0.465$)(图 14)。最后,在时间上,M118-REH 的血浆抗 Xa 因子活性与抗 IIa 因子活性的比值通常比 UFH 稳定,这一点与已知的多分散性 UFH 大分子的可变代谢性相一致。

[0632] 表 16 :选定的血液测试终点的总结

[0633]	处理	ACT(秒) *	抗 Xa 因子活性 (IU±SD) *	抗 IIa 因子活性 (IU±SD) *
[0634]				
[0635]	对照	69±6	0.0±0.0	0.0±0.0
[0636]	M118-REH(37.5 IU/kg) †	101±7 ‡	1.20±0.16	0.64±0.12
[0637]	M118-REH(75IU/kg) †	108±13 ‡	1.66±0.37	0.71±0.20
[0638]	M118-REH(150IU/kg) †	141±28 §	2.31±0.13	1.06±0.09
[0639]	UFH(75U/kg) †	163±55	2.89±1.31	0.95±0.19

[0640] ACT :活化凝血时间 ;IU :国际单位 ;SD :标准偏差 ;UFH :普通肝素

[0641] * 测试物输注起始后 60 分钟记录 ;† 浓注剂量 ;‡ M118-REH 与 UFH $P < 0.05$;

§ M118-REH 与对照相比 $P < 0.01$;|| UFH 与对照相比 $P < 0.01$ 。

[0642] 凝血试验

[0643] 然后比较 M118-REH 与标准剂量 UFH 的抗凝血活性。在所有凝血试验中,M118-REH 的剂量依赖性凝血抑制可在所有凝血试验的 15 分钟内观察到,并在 60 分钟的观察期内得到保持(图 16)。60 分钟时,在 ACT 试验的 UFH 处理组中观察到的凝血时间显著大于 37.5IU 抗 Xa 活性/kg 或 75IU 抗 Xa 活性/kg M118-REH 组(表 16)。ACT 试验中,施用 150IU 抗 Xa 活性/kg M118-REH 时,UFH 与 M118-REH 间的差别不显著(表 16)。对照试验说明,凝血试验中处理组间的差别不是由于纤维蛋白原底物的浓度变化造成的(数据未显示)。

[0644] 抗血栓形成作用

[0645] 由于发现 150IU 抗 Xa 活性/kg M118-REH 具有与 75U/kg 标准剂量的肝素类似的抗凝血性质,因此在犬深动脉血栓模型中,对 150IU 抗 Xa 活性/kg 以及较低剂量 M118-REH 的抗血栓形成效力与 UFH 进行比较。在溶媒输注期间,所有(24/24)动物的对照动脉均在 180 分钟的观察期内发生完全闭塞(图 17)。在 UFH 处理组中,5/6(83.3%)的动物发生模型所定义(model defined)的多普勒血流减少。比较起来,接受 37.5IU 抗 Xa 活性/kg、75IU 抗 Xa 活性/kg 和 150IU 抗 Xa 活性/kg 的 M118-REH 浓注动物中,分别有 3/6(50%)、2/6(33.3%) 和 1/6(16.7%) 的动物发生完全闭塞,这符合剂量依赖关系。M118-REH 组和溶媒处理组的动脉闭塞率差别在所有 M118-REH 浓注中均具有统计显著性 ($P < 0.05$)。150IU 抗 Xa 活性/kg 浓注的 M118-REH 与 UFH 间的差异也具有显著性 ($P < 0.05$)。因此,150IU 抗 Xa 活性/kg M118-REH 具有优于 75U/kg UFH 的效力,尽管在此剂量上 M118-REH

和 UFH 的抗凝血活性相当。测试中具有较低凝血活性的较低剂量 (37.5IU 抗 Xa 活性 /kg、75IU 抗 Xa 活性 /kg)M118-REH 显示了与 UFH 基本相似的抗血栓形成作用。

[0646] 在用溶媒、UFH、M118-REH(37.5IU 抗 Xa 活性 /kg)、M118-REH(75IU 抗 Xa 活性 /kg) 和 M118-REH(150IU 抗 Xa 活性 /kg) 处理的动物中,发生闭塞所需时间分别为 59 ± 25 分钟、 132 ± 42 分钟、 165 ± 23 分钟、 161 ± 41 分钟和 165 ± 36 分钟。应当注意,与实际数值相比,试验低估了活性剂处理动脉的平均闭塞时间,因为很多动脉(特别是在 M118-REH 处理组中的动脉),在预定 180 分钟的终点时也没有发生完全闭塞(分析时任意地将这些动脉的闭塞时间定为 180 分钟)。在经溶媒、UFH、M118-REH(37.5IU 抗 Xa 活性 /kg)、M118-REH(75IU 抗 Xa 活性 /kg) 和 M118-REH(150IU 抗 Xa 活性 /kg) 处理的动脉中,平均血栓重量分别为 24.0 ± 9.15 mg、 19.4 ± 9.47 mg、 24.5 ± 12.17 mg、 19.8 ± 6.24 mg 和 12.8 ± 5.99 mg。处理组之间平均闭塞时间和平均血栓重量的差别不具有统计显著性。

[0647] 皮肤出血时间

[0648] 在方案指定的时间点,所有组在施用溶媒期间的 CBT 都在 80 ± 15.5 秒至 160 ± 52.5 秒之间变化(表 17)。UFH 和 M118-REH 处理使 CBT 稍有增加,并且此影响具有很高的变化性。在所有的时间点,经 UFH 处理后组平均值在 135 ± 90.5 秒至 275 ± 306.8 秒之间;施用 M118-REH 后组平均值在 110 ± 36.3 秒至 190 ± 86.3 秒之间。

[0649] 表 17:皮肤出血时间

[0650]

处理	基线 CBT (秒 \pm SD)	股动脉	CBT (秒 \pm SD)		
			15 分钟	60 分钟	180 分钟
UFH (75 U/kg)	100 ± 31.0	对照	125 ± 29.5	138 ± 45.5	100 ± 36.3
		处理	135 ± 90.5	145 ± 35.1	275 ± 306.8
M118-REH (37.5 IU/kg)	95 ± 35.1	对照	80 ± 15.5	130 ± 36.3	115 ± 58.2
		处理	145 ± 64.1	125 ± 48.1	110 ± 36.3
M118-REH (75 IU/kg)	140 ± 24.5	对照	130 ± 36.3	130 ± 17.3	160 ± 52.5
		处理	160 ± 45.2	190 ± 86.3	160 ± 31.0
M118-REH (150 IU/kg)	110 ± 41.0	对照	115 ± 51.7	110 ± 36.3	115 ± 48.1
		处理	150 ± 50.2	125 ± 64.1	135 ± 94.4

[0651] UFH:普通肝素;SD:标准偏差;IU:国际单位;U:单位。

[0652] 血液动力学参数

[0653] 在试验过程中没有观察到心血管参数或临床化学发生具有临床意义的变化。在试验的全部动物群中,溶媒和活性剂处理动脉在狭窄后充血反应之间的差别 ≤ 13 mL/分钟。除了两条动脉之外均实现了将缺氧诱导的充血反应限制到对物理闭塞的反应基线的 $\leq 80\%$ 的目标:其中一条的反应为 81% (M118-REH[75IU 抗 Xa 活性 /kg];对照动脉),另

一条的反应为 88% (M118-REH[75IU 抗 Xa 活性 /kg] ;活性剂处理动脉)。所有处理组试验期间的平均动脉压和心率分别为 68-78mmHg 和 96-111bpm,接近于方案预定的 70mmHg 和 100bpm 的目标。对于任意给定动物,溶媒处理动脉和活性剂处理动脉之间平均动脉压和心率的差别分别为 6mm Hg 和每分钟 5 次(差异 P 值没有显著性)。

[0654] 总结

[0655] 150IU 抗 Xa 活性 /kg M118-REH 显示出统计学上优于标准剂量 UFH(75U/kg) 的抗血栓形成效力,尽管在 ACT、aPTT 和 PT 试验中,所述浓度的 M118-REH 和 UFH 显示出的活性相当。因此,M118-REH 处理动物中血栓诱导的颈动脉完全闭塞的发生频率显著低于 UFH 处理动物(分别为 1/6[16.7%] 和 5/6[83.3%]; $P < 0.05$)。

[0656] 在 M118-REH 处理中观察到抗血栓形成作用,且没有发现有并发症的证据。没有自发出血的事件,而且在 M118-REH 的所有浓度和试验时间点上仅观察到 CBT 的微小增加。此外,没有发生意外死亡或观察到心血管参数或临床化学发生具有临床意义的变化。

[0657] 此试验中,有两个值得注意的凝血数据特征。第一,通过即时 ACT 试验可检测到 M118-REH 具有剂量依赖性。与 UFH 相比,其 ACT 反应与抗 Xa 因子活性良好相关。这一特征可简化介入性治疗和手术治疗中的 LMWH 施用。第二,M118-REH 不仅具有体外抗 Xa 因子活性,还具有显著的抗 IIa 因子活性,这一特征使 M118-REH 进一步区别于现有的 LMWH(J. Hirsh et al. " Heparin and low-molecular-weight heparin:mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety, " Chest.2001;119:64S-94S)。例如,依诺肝素的特征为 17.2 的抗 Xa 因子活性 / 抗 IIa 因子活性比值;与之相比,UFH 的类似比值为 3.3(U. Cornelli and J.Fareed. " Humanpharmacokinetics of low molecular weight heparins, " Semin Thromb Hemost.1999;25 Suppl 3:57-61)。在此试验中,M118-REH 具有约 2-2.5 的抗 Xa 因子活性 / 抗 IIa 因子活性比值(图 15),这证明相对于其它 LMWH,M118-REH 具有的抗 IIa 因子活性较高。正如对多分散性 UFH 大分子的已知可代谢性的预测,所述比值随时间的变化通常比 UFH 稳定。

[0658] 表 18 :血栓形成和选定的血液测试终点的总结表

[0659]

处理	闭塞 (%)	血栓重量 (mg)	TTO (分钟) ^a	ACT(秒) ^b	抗 Xa 因子 活性 ^b	抗 IIa 因子 活性 ^b
对照 (RFA)	24/24 (100%)	24.0±9.2	59±25	69±6 ^c	0.00±0.00	0.00±0.00
UFH (组 1)	5/6 (83%)	19.4±9.5	132±42 ^c	163±55 ^c	2.89±1.31	0.95±0.19
M118 (组 4)	3/6 (50%) ^c	24.5±12.2	165±23 ^c	101±7 ^d	1.20±0.16	0.64±0.12
M118 (组 2)	2/6 (33%) ^c	19.8±6.2	161±41 ^c	108±13 ^d	1.66±0.37	0.71±0.20
M118 (组 3)	1/6 (17%) ^{c,d}	12.8±6.0 ^c	165±36 ^c	131±16	2.31±0.13	1.06±0.09

[0660] TTO = 发生闭塞所需时间;ACT = 活化凝血时间;RFA = 右股动脉;UFH = 普通肝素;Grp = 组。

[0661] ^aTTO > 180 分钟则设为 180 分钟。

[0662] ^b 在测试物输注开始后 60 分钟记录的值。

[0663] ^c 与对照相比 $P < 0.05$ 。

[0664] ^d 与 UFH 相比 $P < 0.05$ 。

[0665] ^e 与对照相比 $P < 0.01$ 。

[0666] 体内中和:

[0667] 使用 Sprague-Dawley 大鼠和新西兰兔进行体内试验。在 $t = 0$ 时,经静脉施用不同剂量的 M118-REH、依诺肝素或两种普通肝素 (UFH)。t0 后 5 分钟以 0.5mg 和 1mg 硫酸鱼

精蛋白 :100IU 抗 Xa 活性 (或在 UFH 的情况下,为 100USP 单位或 1mg) 的比例通过尾静脉注射硫酸鱼精蛋白,从而评估对各处理药理作用的中和。在基线 (鱼精蛋白注射前) 和施用硫酸鱼精蛋白 5、30 和 60 分钟后收集血样并检测抗 Xa 活性和抗 IIa 活性。

[0668] 以 0.5mg 硫酸鱼精蛋白 :100IU 抗 Xa 活性 (在大鼠中 > 98%) 和 1mg 硫酸鱼精蛋白 :100IU 抗 Xa 活性 (在大鼠中 > 99%,在兔中为 95%) 的比例经静脉递送硫酸鱼精蛋白 5 分钟后,可实现硫酸鱼精蛋白对 M118-REH 抗 Xa 活性的完全而快速的体内中和。在施用硫酸鱼精蛋白 1 小时之内没有观察到抗 Xa 活性的“反弹”。

[0669] 以 0.5mg 和 1mg 硫酸鱼精蛋白 :100IU 抗 Xa 活性 (或 100USP 或 1mgUFH) 的比例时,M118-REH 和 UFH 对抗 Xa 活性的中和程度相当。以 0.5mg 和 1mg 硫酸鱼精蛋白 :100IU 抗 Xa 活性向施用依诺肝素的大鼠注射硫酸鱼精蛋白 5 分钟后,分别保留了 40% 以上和 20% 以上的抗 Xa 活性。以 1mg :100IU 抗 Xa 活性向施用依诺肝素的兔注射硫酸鱼精蛋白 10 分钟后,约保留了 38% 的抗 Xa 活性。比例为 0.5mg 和 1mg 硫酸鱼精蛋白 :100IU 抗 Xa 活性时,每种肝素的抗 Xa 活性被中和超过 90%。在三个处理 (即 M118-REH、依诺肝素或 UFH) 中,硫酸鱼精蛋白逆转抗 IIa 活性的数量级相当。所述结果显示在图 11 中。

[0670] 在猕猴中,硫酸鱼精蛋白 (PS) 以剂量依赖方式将 M118-REH 的抗 Xa 和抗 IIa 活性逆转了相似程度。经静脉向清醒猕猴施用 M118-REH,在一些情况下,随后施用 PS。收集血液样品,并通过抗 Xa 活性、抗 IIa 活性和凝血特征测定 M118-REH 的浓度。对血液学、皮肤出血时间和临床毒性症状进行 24 小时监测。

[0671] 在以 150IU 抗 Xa 活性 /kg 的剂量经静脉施用 M118-REH 后即可检测其活性。试验观察到 M118-REH 的一级消除动力学参数, $t_{1/2}$ 为 0.50 ± 0.04 小时 (抗 Xa 活性) 和 0.68 ± 0.05 小时 (抗 IIa 活性)。此外,PS 以剂量依赖的方式迅速逆转了 M118-REH 的抗 Xa 活性和抗 IIa 活性。PS 在试验中的较高剂量 (每 100IU 抗 Xa 活性 :1.5mg PS 的比例) 可快速中和大部分抗 Xa ($93.6 \pm 1.2\%$) 和抗 IIa ($90.14 \pm 1.2\%$) 活性。ACT 和 aPTT 测定与抗 Xa 活性紧密相关 (分别为 $r^2 = 0.95$ 和 $r^2 = 0.99$)。M118-REH 使 ACT 延长 2-3 倍,并在静脉施用 PS 后 5 分钟之内被逆转至基线值。没有发现临床毒性或不良出血的症状。

[0672] 施用 M118-REH 可引发快速和持续的抗凝血反应,而此抗凝血反应可通过 PS 注射迅速逆转。可通过 ACT 和 aPPT 简单地测定并监测 M118-REH 的抗凝血作用。与其它商购 LMWH 相比,M118-REH 具有独特的可逆性和可监测性。

[0673] 以下表 19 ~ 21 显示了 NHP 模型中 M118-REH 中和试验的结果。

[0674] 表 19 :NHP 模型中的 M118-REH 中和——给药后大多数 aPTT 和 ACT 回复至正常水平

[0675]

		UFH ^{^^} 1mg: 100 IU	M118-REH [^] 1mg:100 IU 抗 Xa 活性	M118-REH [^] 1.5mg:100 IU 抗 Xa 活性	M118-REH ^{^^} 2mg:100 IU 抗 Xa 活性
ACT	基线	99.5 ± 9.2	85.3 ± 4.2	93.0 ± 5.1	97.0 ± 4.2
	施用 M118-REH 后	168.5 ± 14.9	174.3 ± 12.3	193.0 ± 9.7	139.0 ± 21.2
	施用鱼精蛋白 后 5 分钟	97.5 ± 14.9	103.0 ± 4.4 (NS)	99.2 ± 7.5 (NS)	89.5 ± 0.7 (NS)
	基线	31.95 ± 0.1	23.4 ± 2.7	20.4 ± 0.9	26.1 ± 0.8
aPTT	施用 M118-REH 后	46.9 ± 31.9 [†]	177.9 ± 59.0*	162.6 ± 85.5*	48.1 ± 1.8
	施用鱼精蛋白 后 5 分钟	24.2 ± 0.4	32.5 ± 4.4	29.6 ± 6.0 (NS)	25.9 ± 1.6 (NS)

[0676] NS :与 UFH 相比无显著差异

[0677] * 一些样品中 aPTT > 212 秒 ; [†]UFH 给药后低于基线 1/2

[0678] [^] 以 150IU/kg 经静脉施用 M118-REH ; ^{^^} 以 75IU/kg 经静脉施用 M118-REH, 以 75IU/kg 施用 UFH

[0679] 表 20 :NHP 模型中的 M118-REH 中和——保留显著的抗 Xa/IIa 活性

[0680]

	UFH 1mg: 100 IU	M118-REH 1mg:100 IU 抗 Xa 活性	M118-REH 1.5mg:100 IU 抗 Xa 活性	M118-REH 2mg:100 IU 抗 Xa 活性
抗 Xa	基线	0.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	施用 M118-REH 后	2.0 ± 0.3	3.6 ± 0.4	6.1 ± 0.8
	施用鱼精蛋白后 5 分钟	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.1
抗 IIa	基线	0.4 ± 0.4	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0
	施用 M118-REH 后	1.9 ± 0.4	2.1 ± 0.3	3.0 ± 1.2
	施用鱼精蛋白后 5 分钟	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1

[0681] 表 21 :NHP 模型中的 M118-REH 中和——施用鱼精蛋白后不同参数的减少

[0682]

百分比

	UFH 1mg: 100 IU	M118-REH 1mg:100 IU 抗 Xa 活性	M118-REH 1.5mg:100 IU 抗 Xa 活性	M118-REH 2mg:100 IU 抗 Xa 活性
ACT	41.5 ± 14.0	40.8 ± 2.2	47.7 ± 1.2	34.9 ± 9.4
aPPT	32.4 ± 46.9	80.6 ± 5.4	74.8 ± 16.2	46.0 ± 16.9
抗 Xa 活性	97.3 ± 3.8	85.2 ± 2.0	93.6 ± 1.2	84.0 ± 9.1*
抗 IIa 活性	97.2 ± 3.9	83.4 ± 4.2	90.1 ± 1.2	75.1 ± 10.1*

[0683] †等式 : (施用 M118-REH 后 - 施用鱼精蛋白后) * 100 / 施用 M118-REH 后

[0684] * 试验不稳定

[0685] 临床前模型的体内床边检测试验 :

[0686] 以不同的剂量经静脉向大鼠或兔施用 M118-REH、依诺肝素和普通肝素。收集血液样品用于 ACT 测定和抗 Xa 测试。在 ACT 测定中使用 Hemachron Junior 和 ACT plus 管, 并使用 Coag-A-Mate MTX II 测定抗 Xa 活性。比较这三种肝素抗 Xa 和 ACT 之间的相关性。在新西兰白兔中, 通过耳缘静脉注射 1mg/kg M118-REH 和 UFH。在递送肝素后 5 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时收集血液样品。在 Sprague-Dawley 大鼠中, M118-REH 和 UFH 以 0.5mg/kg 和 1mg/kg 给药, 而依诺肝素以 1mg/kg 和 2mg/kg 给药。这些剂量在大鼠

和兔中均使抗 Xa 活性显著增加并显著延长 ACT。对于 M118-REH, 其抗 Xa 活性与 ACT 的相关因子 (r^2) 在兔和大鼠中分别为 0.79 和 0.85。对于 UFH, 其抗 Xa 活性与 ACT 的相关因子 (r^2) 在兔和大鼠中分别为 0.31 和 0.79, 而对于依诺肝素, 该相关因子在大鼠中仅为 0.66。所述结果显示于图 12 中。

[0687] 在 NHP 模型中, 静脉注射后, M118-REH 表现出一级消除, 通过抗 Xa 和抗 IIa 测定, 其半衰期分别为 0.50 ± 0.04 小时或 0.68 ± 0.05 小时。分布容积 (distribution volume, Vd) 分别为 32.01 ± 2.21 (抗 Xa 活性) 或 48.58 ± 0.95 mL/kg (抗 IIa 活性)。清除率 (Cl) 为 37.24 ± 4.65 mL/hr/kg (抗 Xa 活性) 和 43.92 ± 5.38 mL/hr/kg (抗 IIa 活性)。其 ACT 和 aPTT 结果与抗 Xa 活性密切相关 (相关比分别是 $r = 0.95$ 和 $r = 0.99$)。

[0688] 体内出血试验:

[0689] 使用不同的化学或酶促方法解聚普通肝素从而产生低分子量肝素。在新抗血栓形成剂研发过程中常采用出血时间测定作为出血风险性的指示。此试验的目的是通过对 M118-REH 进行标准出血时间测试研究出血风险性, 并将其风险性与使用依诺肝素和普通肝素进行类似处理后的出血风险性进行比较。

[0690] 以 0.5 mg/kg 的单次浓注通过耳缘静脉向兔施用 M118-REH、依诺肝素和普通肝素。在基线以及施用测试物 5、15、30、60、120 和 180 分钟后在耳部进行出血时间 (BT) 测定。与施用后 60 分钟相比, 在第 5 分钟时 M118-REH 使 BT 延长了 3-4 倍 ($p < 0.05$)。在使用依诺肝素和 UFH 处理时观察到类似的 BT 反应。在第 120 分钟, 出血时间回复到正常范围之内, 并在剩余的时间点保持在基线值附近。在所测试的剂量下没有在任何处理组中观察到其它不良临床发现。

[0691] 如表 22 所示, 在 NHP 模型中, M118-REH 在静脉注射后导致 Curtiss 出血时间 (CBT) 延长, 与基线之间没有统计显著性 ($p < 0.05$)。

[0692] 表 22 : 以 150 IU 抗 Xa 活性 /kg 向 NHP 模型静脉注射 M118-REH 后的 CBT

[0693]

时间点 (小时)	0	0.25	1	1.5
出血时间 (分钟)	13 ± 0.6	2.5 ± 0.7 NS	2.5 ± 1.0 NS	2.5 ± 1.3 NS

[0694] 在比格犬中, UFH 在浓注和连续输注后产生的 CBT 比 M118-REH 长。

[0695] 体内凝血系统:

[0696] 血小板相互作用

[0697] 在 NHP 模型中, 在静脉浓注施用 M118-REH 后没有观察到对 ADP 引发的血小板凝集的影响。

[0698] 对纤维蛋白溶解途径的干涉:

[0699] 在 NHP 模型中, 如下表 18 所示, 在静脉浓注施用 M118-REH 后, 纤维蛋白原水平保持恒定, 并且与基线之间没有统计显著性。

[0700] 表 23 : 以 150 IU 抗 Xa 活性 /kg 向 NHP 模型静脉注射 M118-REH 后的纤维蛋白原和凝血酶原时间 (PT)

[0701]

	纤维蛋白原 (mg/dL)	凝血酶原时间 (秒)
基线	174.3±35.0	11.4±0.5
5 分钟	168.3±28.0	16.0±0.9**
30 分钟	166.0±30.5	13.8±0.9*
60 分钟	172.0±29.7	14.1±1.1*
90 分钟	170.0±27.9	12.8±2.2
360 分钟	163.7±29.5	11.4±0.9
360 分钟	164.3±27.0	10.8±0.3
1440 分钟	176.0±2.0	10.7±0.3

[0702] 多级递增剂量试验：

[0703] 在大鼠的重复 IV 给药试验中的第 0 和第 13 天,显示 M118 接触量的增加与剂量的增加成比例。在雄性大鼠中,在第 0-13 天,以总抗 Xa 活性计算的 M118 接触量增加,而以总抗 IIa 活性计算的 M118 接触量则保持相似的水平。在雌性大鼠中,在第 0-13 天 M118 接触量减少。在第 0 天,雌性大鼠显示高于雄性大鼠的 M118 接触量,但在第 13 天,M118 接触量在性别间类似。在对犬的重复 IV 给药试验中, M118 的全身接触量随剂量的增加 (5-50mg/kg/ 天的剂量范围) 而增加。然而, M118 接触量没有随 M118 的增加而成比例增加。在 14 天的周期内没有积累的证据。犬血浆中抗 Xa 和抗 IIa 活性的半衰期范围是 1.0-3.2 小时,没有与剂量或性别相关的特别趋势。在第 13 天的半衰期常短于第 0 天。M118 剂量与抗 Xa 和抗 IIa 活性的表观全身清除率或表观分布容积之间没有协同化趋势。

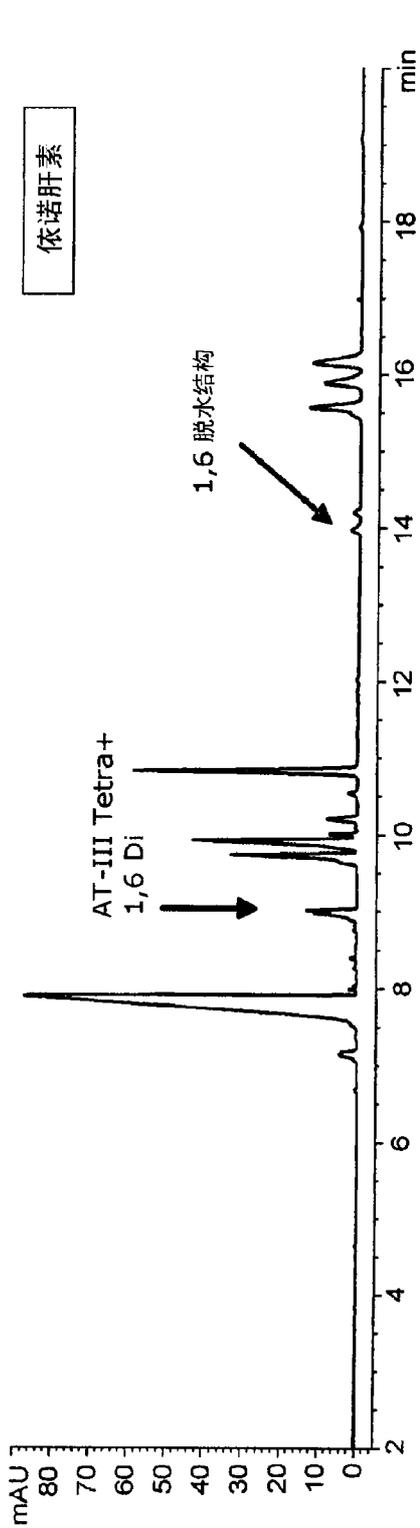


图2A

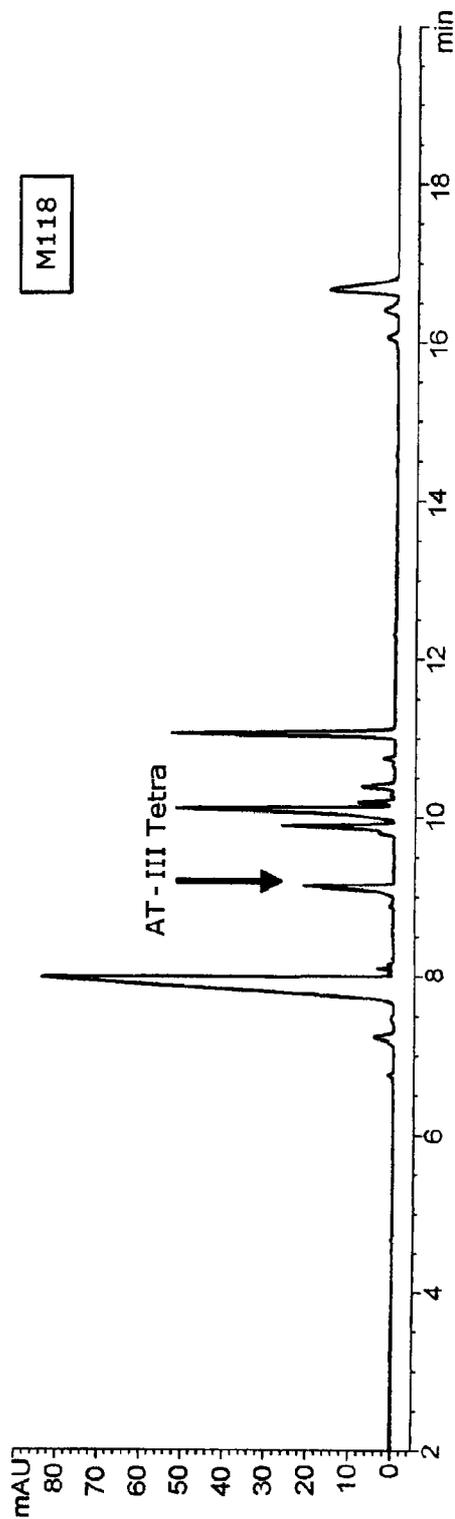


图2B

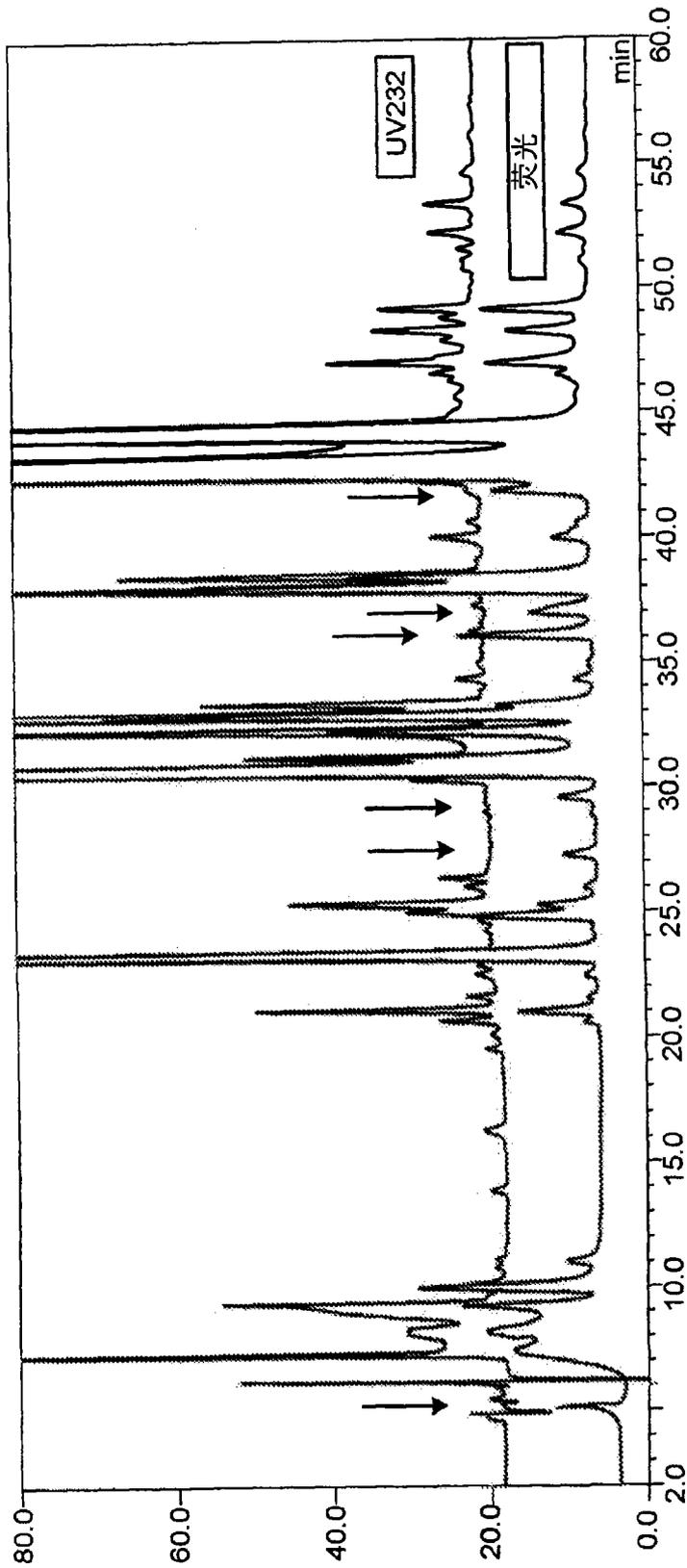


图3

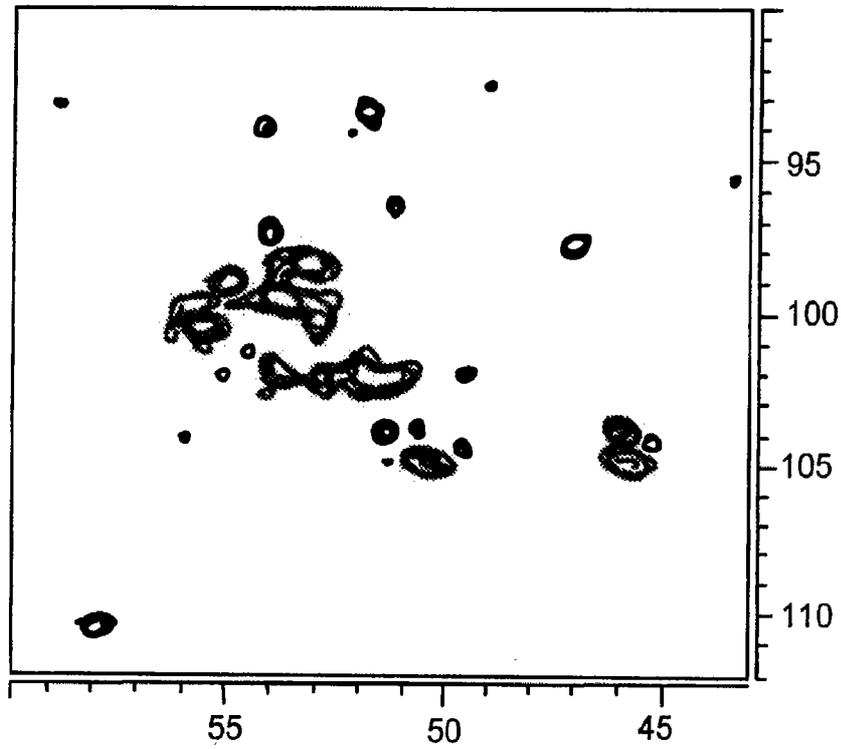
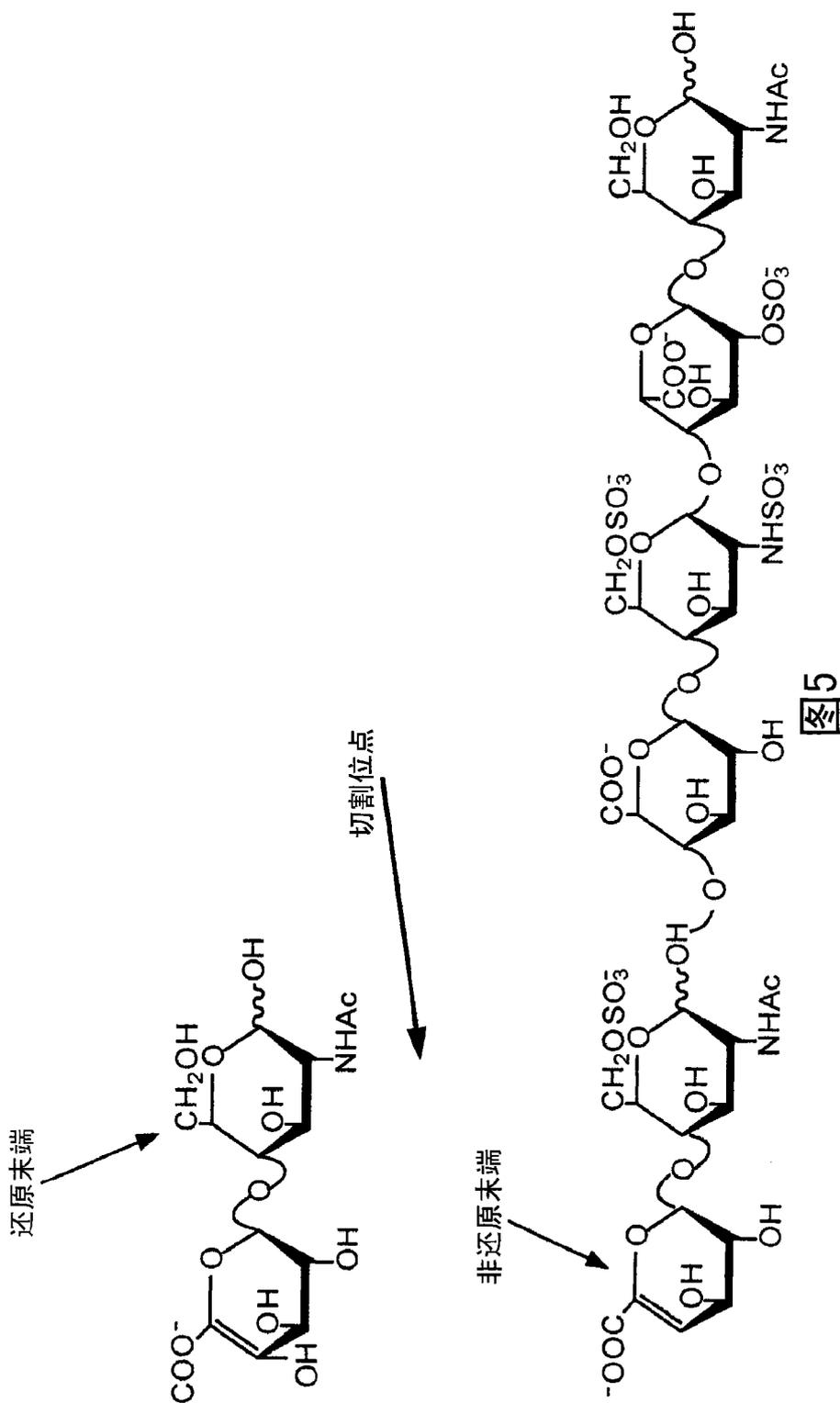


图 4



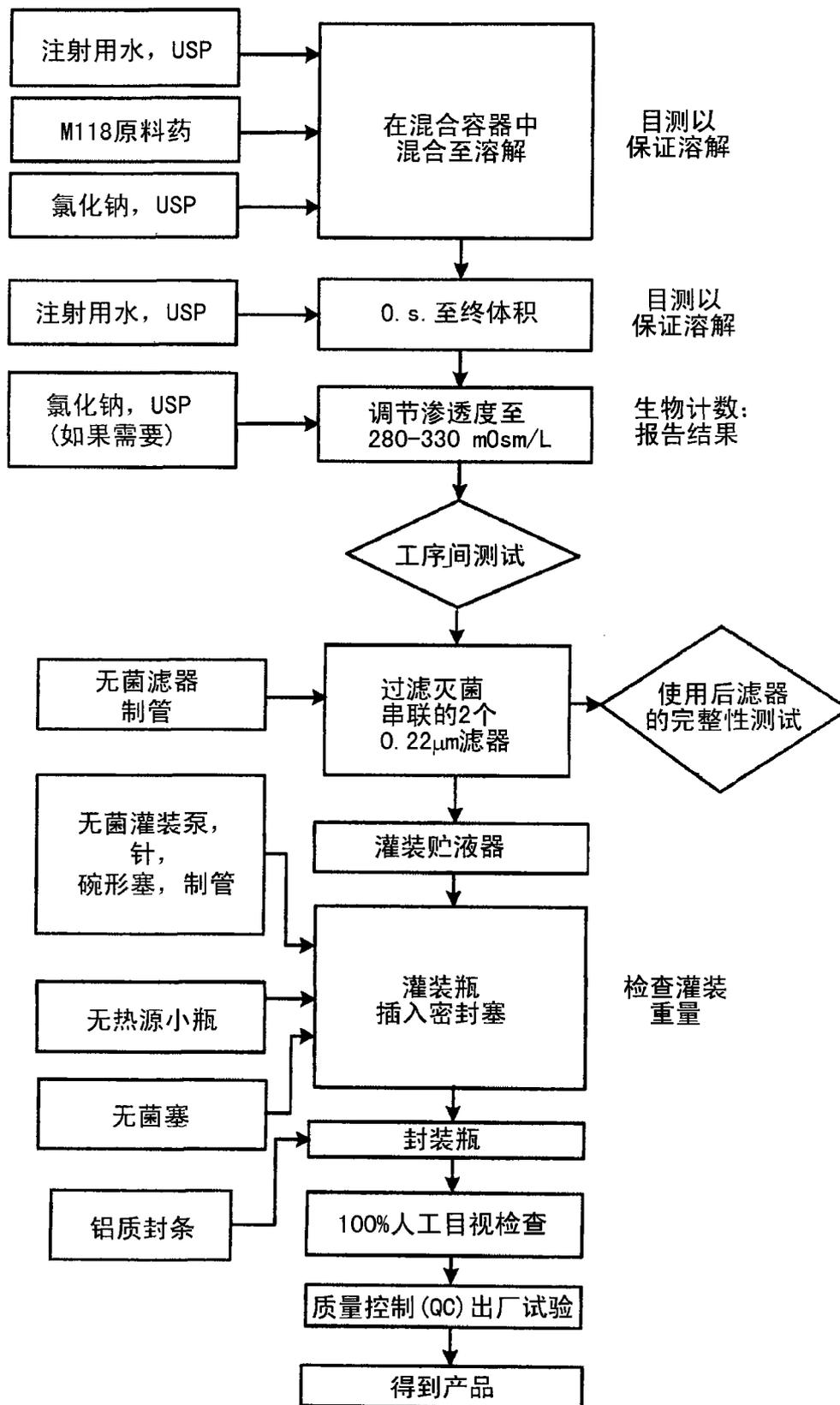


图 6

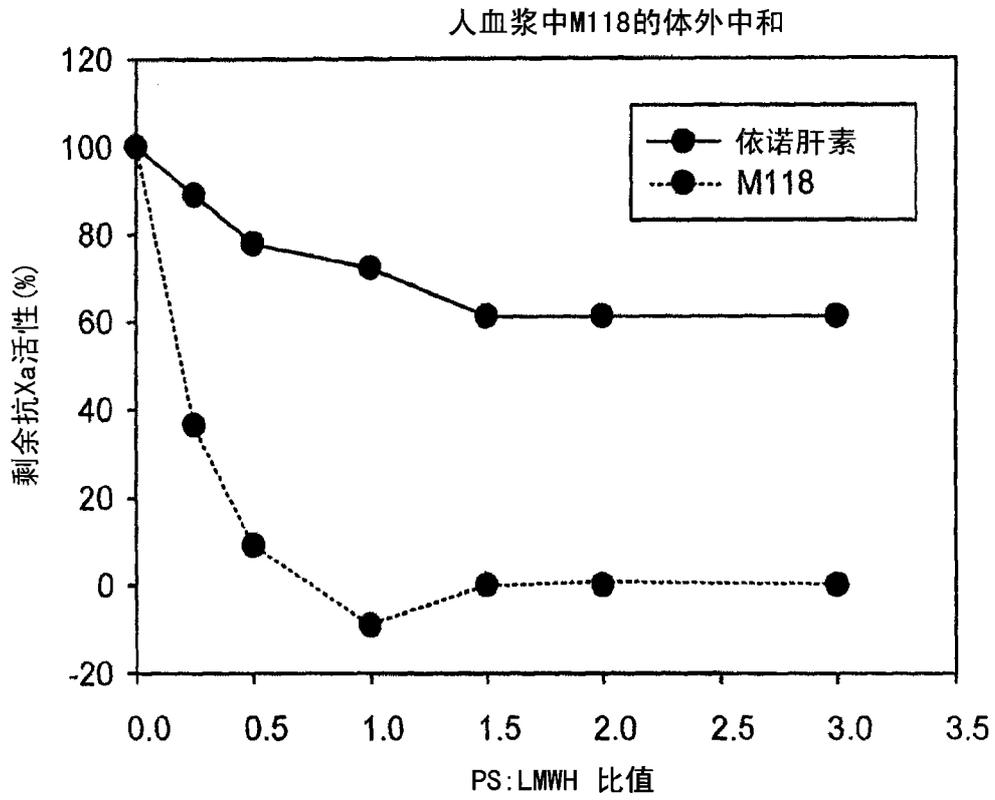


图 7

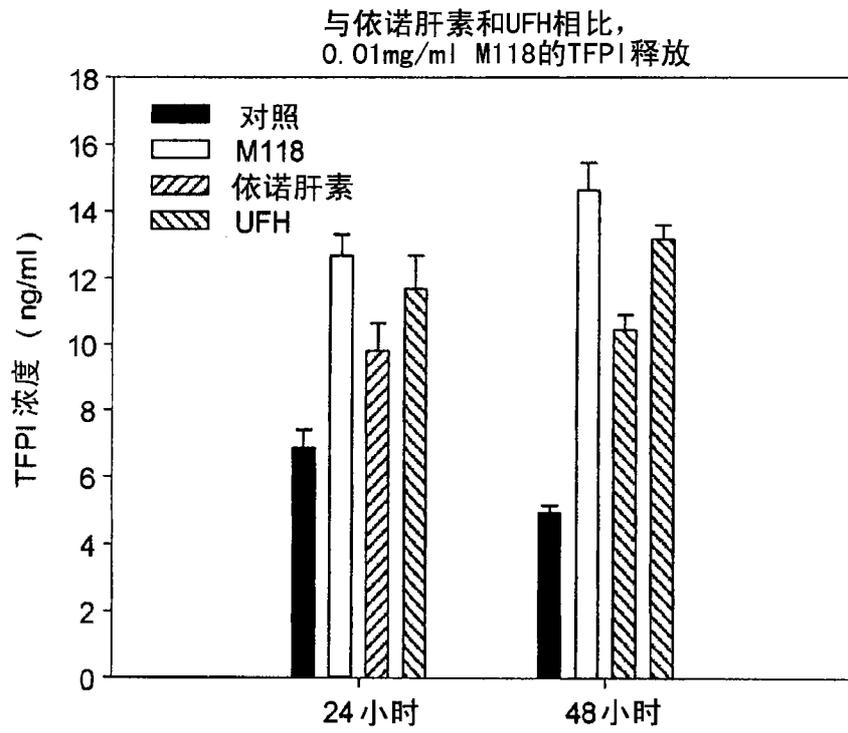


图 8

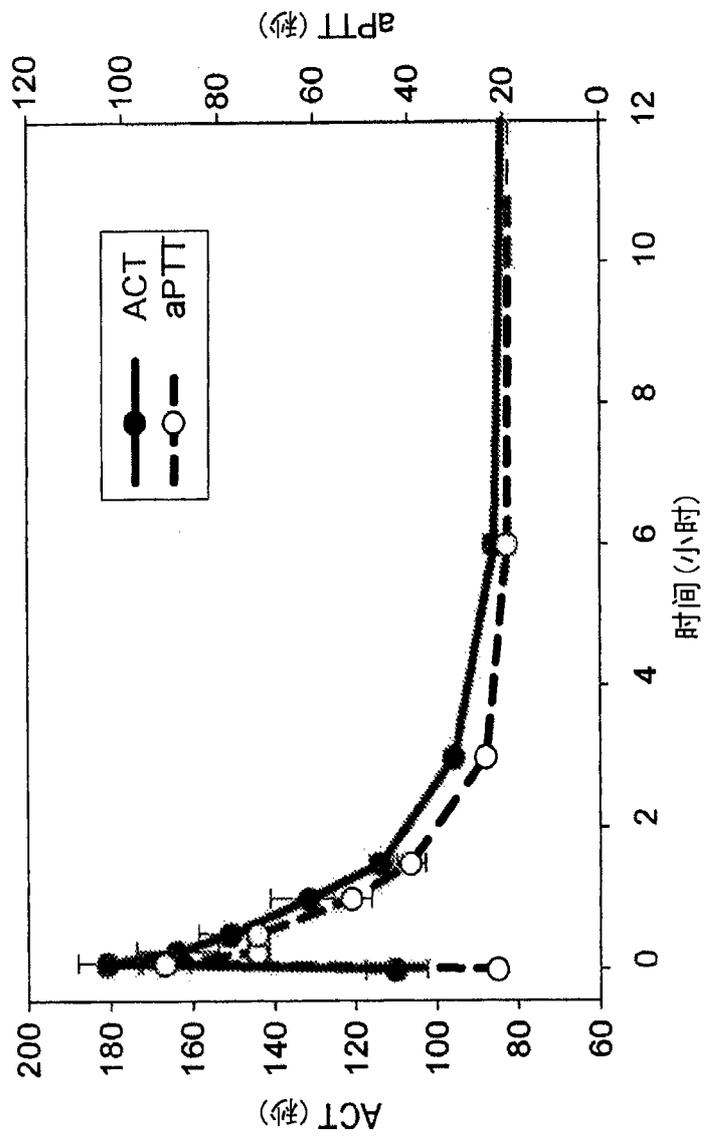


图9

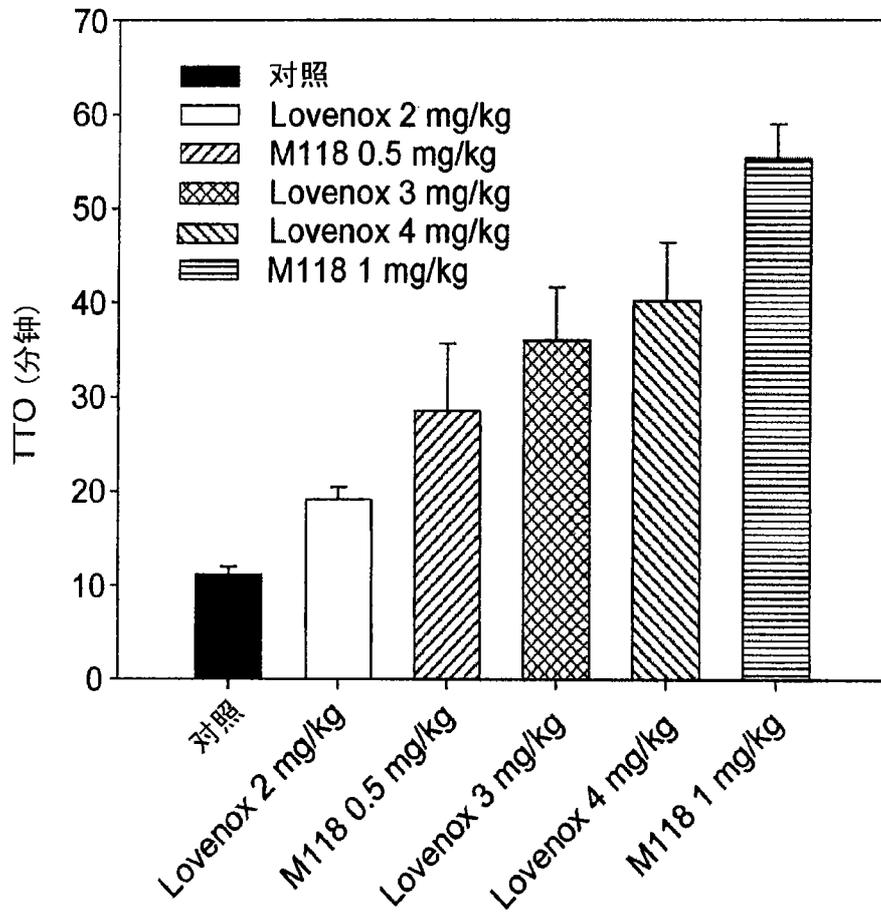


图 10

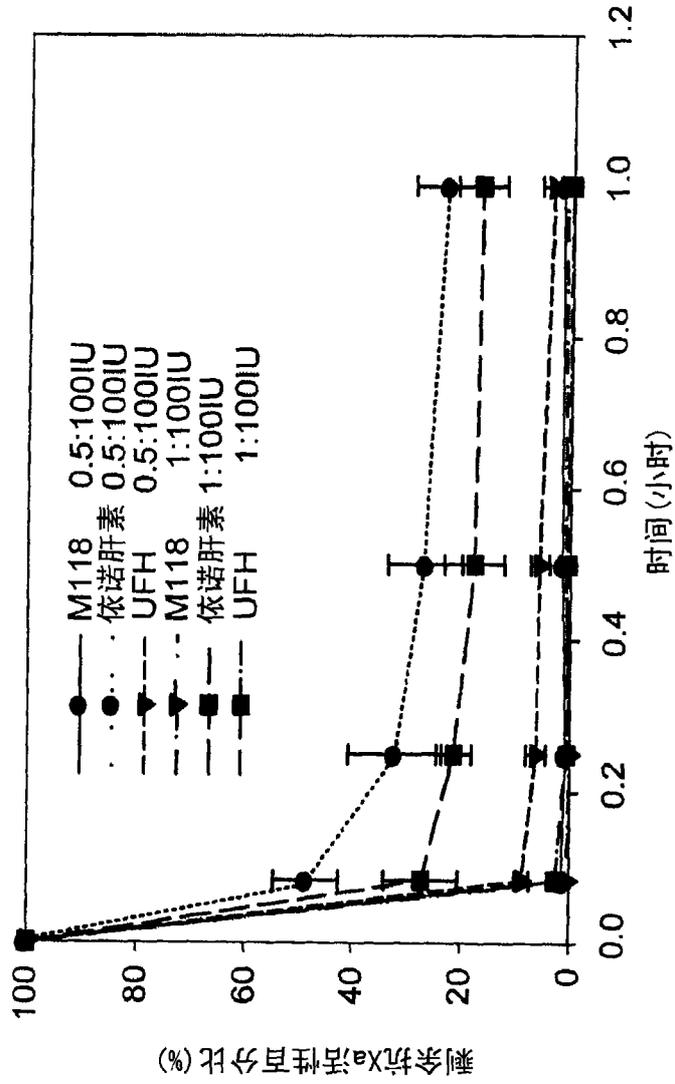


图11

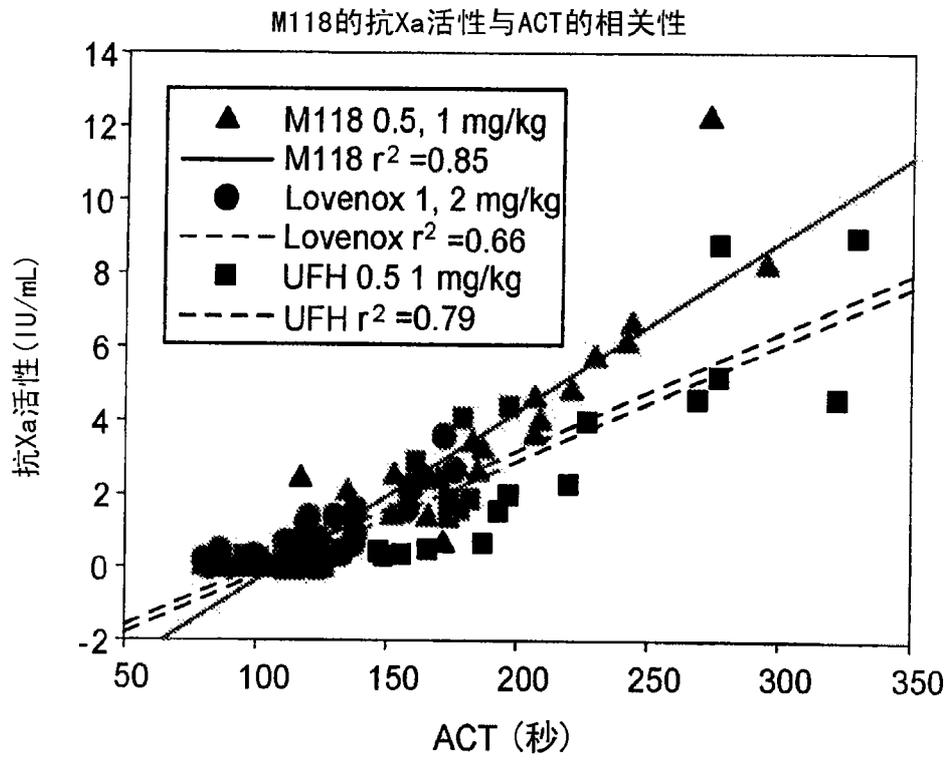


图 12

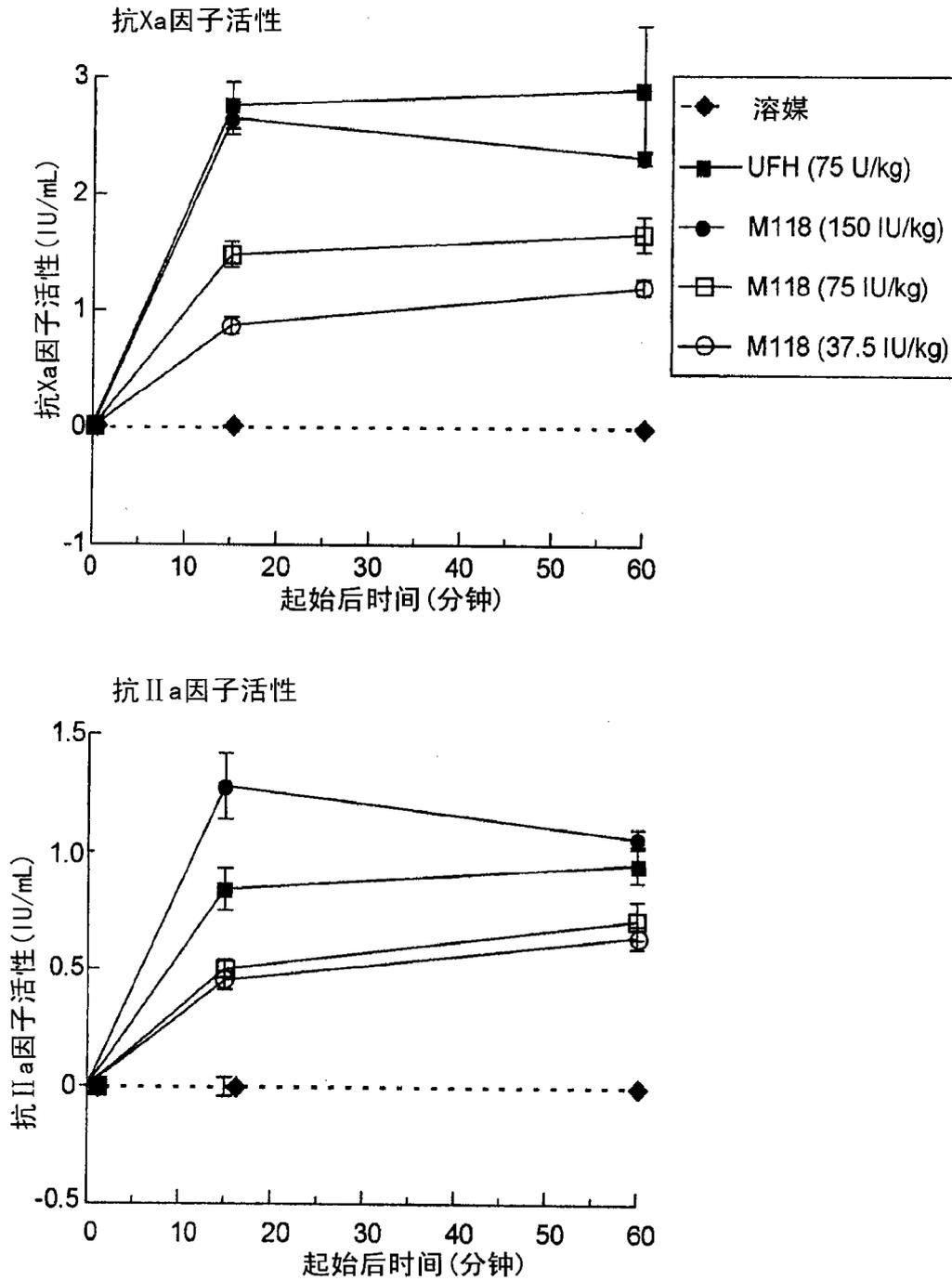


图 13

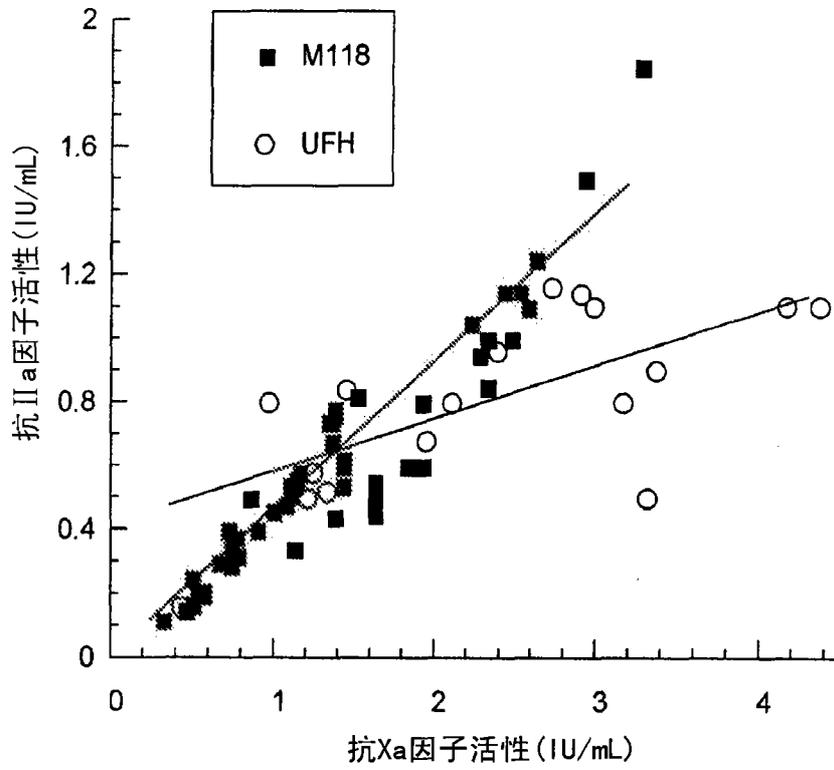


图 14

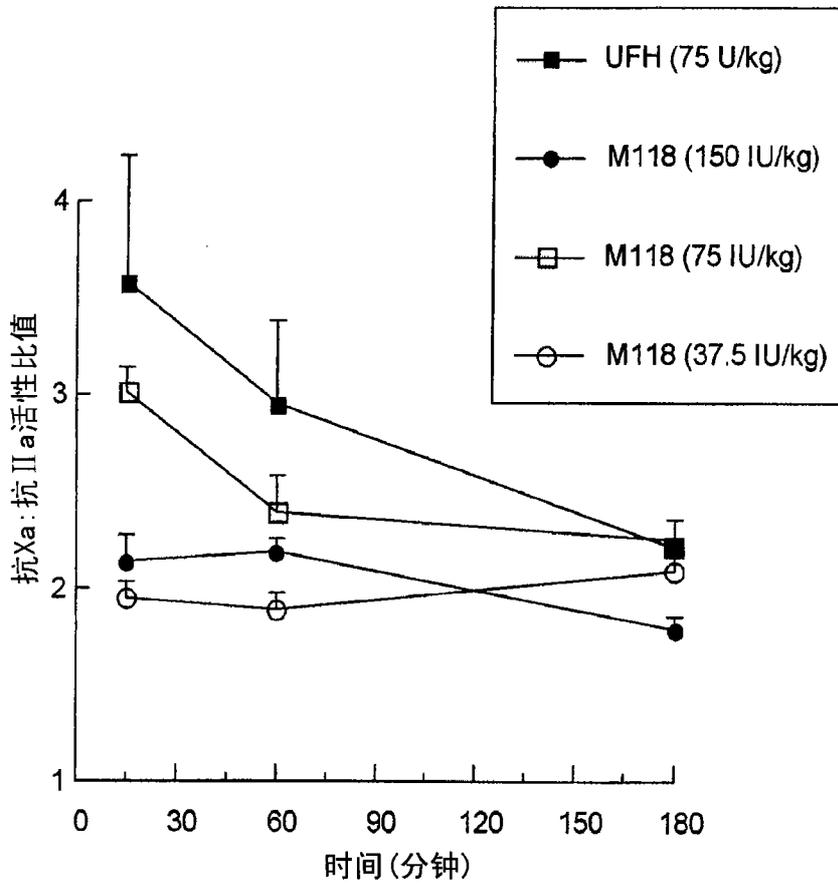


图 15

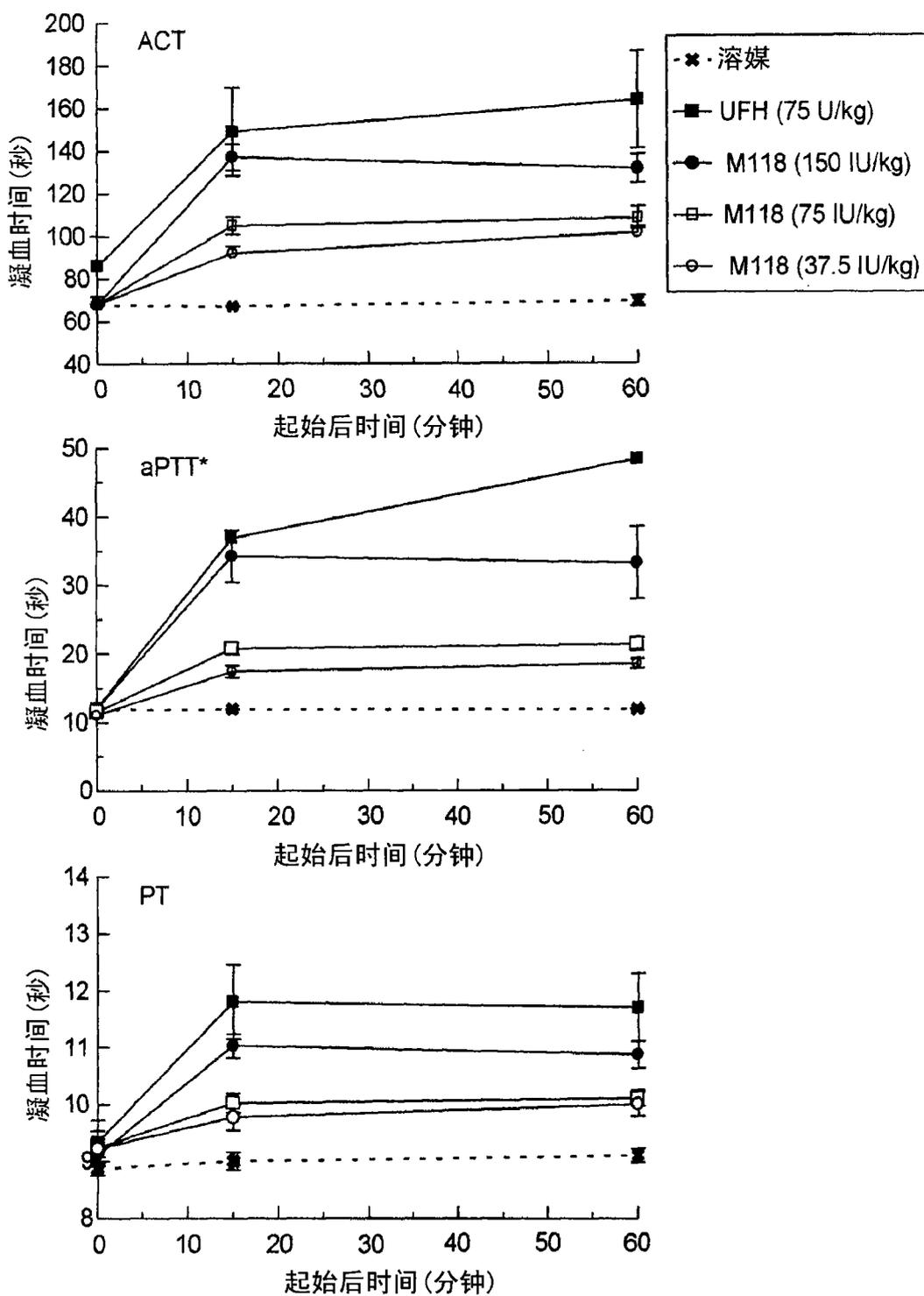
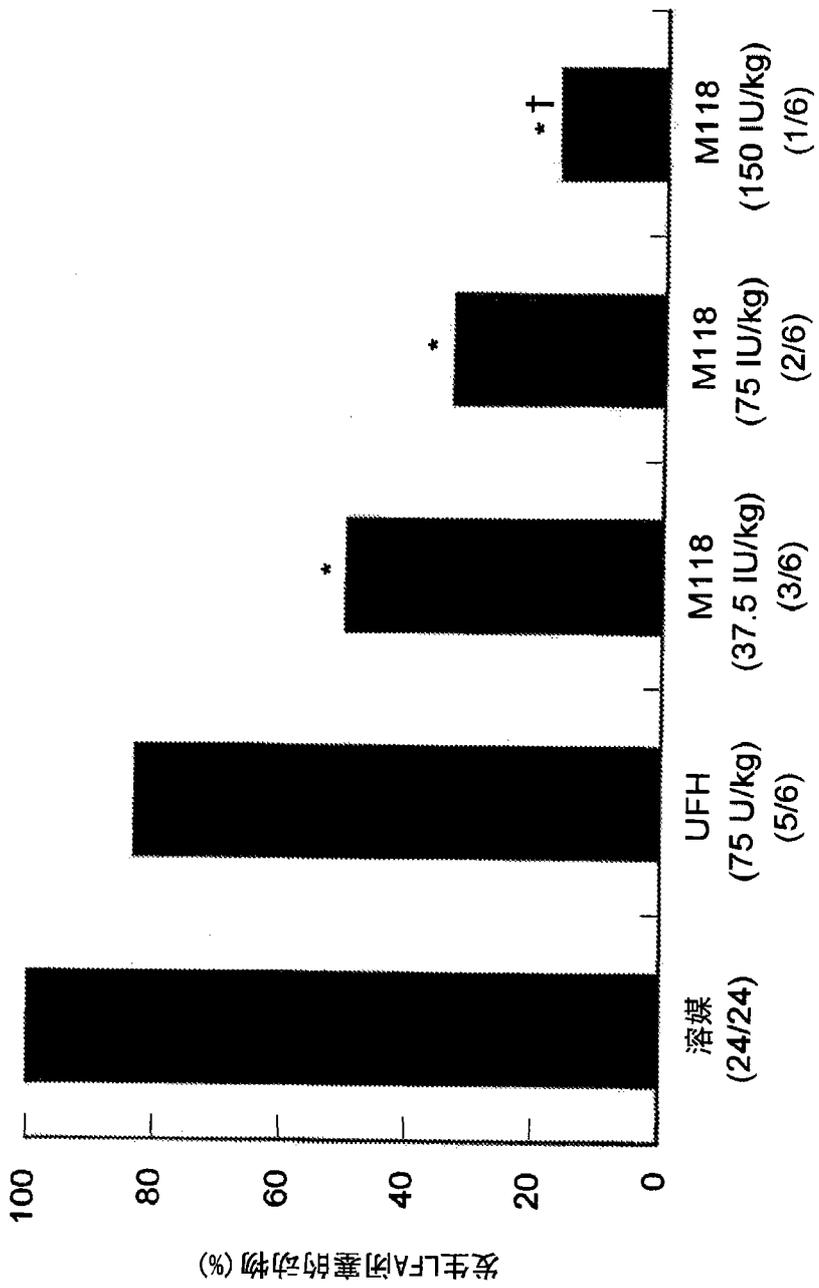


图 16



*与对照相比 $P < 0.05$; †与UFH相比 $P < 0.05$

图17