



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **NR. 157147**

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl.⁴ **C 08 B 37/08**

(21) Patentsøknad nr. **821551**

(22) Inngivelsesdag **11.05.82**

(24) Løpedag **11.05.82**

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -

(86) Internasjonal inngivelsesdag -

(85) Viderefereringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra **12.11.82**

(44) Utlegningsdag **19.10.87**

(72) Oppfinner **KARL HELMUT WOLF, München, BRD.**

(71)(73) Søker/Patenthaver **LUITPOLD-WERK
CHEMISCH-PHARMAZEUTISCHE
FABRIK GMBH & CO.,
Zielstattstrasse 9,
D-8000 München 70,
BRD.**

(74) Fullmektig **Cand.mag. Johan H. Gørbitz,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.**

(30) Prioritet begjært **11.05.81, DE,
nr. P 31 18 588.**

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV ET
INJISERBART CHONDROITIN-POLYSULFAT.**

(57) Sammendrag Fremgangsmåte for fremstilling av et injiserbart chondroitin-polysulfat som er karakterisert ved at
A rå chondroitin-polysulfat depolymeriseres oksydativt, B det depolymeriserte chondroitin-polysulfat blekes, om nødvendig, med pereddiksyre,
C produktet oppnådd etter A eller B underkastes en eller to utfellinger med metanol og/eller ultrafiltrering for molekylvekt-fraksjonering,
D produktet oppnådd etter C demineraliseres, om nødvendig, med kation-vekslere og
E produktet oppnådd etter C eller D avfarves, om nødvendig, med aktivt kull.
Chondroitin-polysulfat som kan fremstilles etter ovennevnte prosess.
Chondroitin-polysulfat med en akutt toksisitet (LD₅₀) som ved intravenøs administrering er >3.500 mg/kg i NMRI mus, >3.000 mg/kg i Wistar rotter, >1.000 mg/kg i katt og >1.000 mg/kg i hund.
Farmasøytisk preparat for human- og veterinær-medisin som er karakterisert ved at det inneholder et chondroitin-polysulfat fremstillet etter ovennevnte prosess eller et chondroitin-polysulfat med de ovenfor nevnte karakteristika.

(56) Anførte publikasjoner **USA (US) patent nr. 3405120 (536-53), 3454560 (536-53).
C.A. vol. 81, 1974, 136411 q.**

Såvel fremstilling av chondroitin polysulfat, spesielt sulfatering av chondroitin sulfat, som de forskjellige måter å behandle rå chondroitin polysulfat produkter på for å rense dem, er tidligere beskrevet (S. Bergstrøm, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chemie 238, 163; 1936 - Chargaff, F.W. Bancroft J. biol. Chem. 115, 149, 155; 1936 - Husemann et al. Z. Ges. Exp. Med. 114, 722; 1945 - J. Piper Acta Pharm. Toxicol. 2, 317; 1946 - P. Karrer, H. Koenig, E. Usteri, Helv. chim. acta 26, 1296; 1943 - Tysk patentskrift 870.094 - Tysk patentskrift 935.843 - Tysk patentskrift 968.752 - Tysk utlegnings-skrift 1.618.857 - U.S. patentskrift 3.454.560 og Østtysk patentskrift 136.572). Ingen av disse fremgangsmåter fører imidlertid til et tilfredsstillende produkt.

Toksisiteten som på tross av tekniske fremskritt fremdeles er for høy, og andre ulemper ved tidligere chondroitin polysulfat-produkter, forbyr risikofri terapeutisk anvendelse av disse forbindelser som injeksjon.

Hensikten med foreliggende oppfinnelse har derfor vært å oppnå, på en økonomisk fordelaktig måte, et chondroitin polysulfat av høy renhet hvor de negative sider av kjente produkter er redusert til et minimum. Et slikt chondroitin polysulfat skulle kunne benyttes terapeutisk etter enhver hvilken som helst administrasjonsmåte både innen human og veterinærmedisinen.

Dette er oppnådd gjennom en fremgangsmåte hvor det essensielle fremgår av arten og rekkefølgen av følgende prosess-trinn: oksydativ depolymerisering av rått chondroitin-polysulfat av tidligere kjent kvalitet, eventuell bleking med pereddiksyre, isolering av en fraksjon med en gjennomsnittlig molekylarvekt på 5.000-15.000 ved utfelling med metanol og/eller ultrafiltrering, eventuelt demineralisering på ionevekslere og behandling med aktivt kull, om nødvendig.

Oppfinnelsen angår således en fremgangsmåte for fremstilling av et injiserbart chondroitin-polysulfat, som er karakterisert ved at

- a) rått chondroitin-polysulfat depolymeriseres oksydativt,
- b) det depolymeriserte chondroitin-polysulfatet blekes, om nødvendig, med pereddiksyre,
- c) fra produktet som erholdes fra trinn a eller b isoleres en bestemt fraksjon med hensyn på molekylvekten ved å fjerne materialet med høyere molekylvekt ved metanolutfelling under anvendelse av 25-45 % metanol av blandingens hele volum eller ultrafiltrering under anvendelse av en filtreringsmembran med en ekskluderingsgrense på minst 6000, og skille materialet som fører til fraksjonen fra materialet med lavere molekylvekt med en andre metanolutfelling under anvendelse av 60-85 % metanol av blandingens hele volum, eller med en andre ultrafiltrering under anvendelse av et filtreringsmedium med en ekskluderingsgrense på maksimalt 8000,
- d) produktene som erholdes etter c demineraliseres, om nødvendig, med kationbytter, og
- e) produktene som oppnås etter c og d avfarges, om nødvendig, med aktivt kull.

Kjente fremgangsmåter, f.eks. som beskrevet i ovennevnte referanser, kan benyttes for å oppnå det rå chondroitin polysulfat som utgjør utgangsmaterialet. Uten å begrense oppfinnelsen til denne, eller en av de nevnte fremgangsmåter for fremstilling av rå chondroitin polysulfat, er det mulig å gå ut fra et produkt oppnådd ved sulfatering av chondroitin-sulfat med pyridin og klorsulfonsyre. Chondroitin-polysulfat av vidt varierende farvenyanser kan benyttes. Det er også mulig å bruke høy-molekylære chondroitin-polysulfater fra trinn C ifølge foreliggende fremgangsmåte.

For regulering av pH-verdien i fremgangsmåten som skal beskrives, kan følgende reagenser benyttes: uorganiske syrer som f.eks. saltsyre, og lavere alifatiske karboksylsyrer eller persyrer, f.eks. eddiksyre eller pereddiksyre, og alkalier som alkalimetallhydroksydløsninger, f.eks. natriumhydroksyd eller kaliumhydroksyd. De enkelte prosess-trinn utføres fortrinnsvis under normaltrykk. Om intet annet er angitt, er prosentdata i den etterfølgende tekst "vekt/volum" data. I foreliggende fremgangsmåte er metanol presipiteringsmidlet for mellomprodukter og sluttproduktet. Andre organiske væsker som er blandbare med vann, f.eks. etanol, isopropanol, aceton, tetrahydrofuran og dioksan, er imidlertid også egnet. Mellomproduktene fra de enkelte prosessstrinn behøver ikke nødvendigvis isoleres som tørre substanser. Det er også mulig å benytte løsningsmiddel-fuktige masser uten tørring. Salter i konsentrasjonsområdet 0,1-10%, fortrinnsvis 0,5-5%, kan med fordel tilsettes under utfelling av chondroitin polysulfatene med vann-blandbare løsningsmidler. Natrium- eller kalium-klorid og natrium- eller kalium-acetat er spesielt egnede salter.

Betingelsene for prosessens trinn A til E, som er mer utførlig omtalt i det følgende, kan varieres betydelig. De nedenfor angitte parametere for de enkelte trinn, er således ikke å forstå som obligatoriske, men som en fordelaktig utførelsesform.

Chondroitin-polysulfat kan depolymeriseres med hydrogenperoksyd i fravær av tungmetaller. Depolymeriseringstrinnet kan utføres i vandig løsning under følgende betingelser: konsentrasjonen av det rå chondroitin-polysulfat kan være 2-35%, fortrinnsvis 10-20%. Hydrogenperoksydkonsentrasjonen i reaksjonsmediet kan være 0,3-15%, fortrinnsvis 1-5%. Reaksjonstemperaturen kan være 20-100°C, fortrinnsvis 50-100°C. Reaksjonstiden strekker seg fra 10 minutter til 24 timer, fortrinnsvis fra 30 til 200 minutter. pH kan eventuelt holdes konstant mellom 3 og 9, fortrinnsvis mellom 4,5 og 7.

Tilstedeværende tungmetaller kan blokkeres med kompleksdannere som nitrilotrieddiksyre, etylendinitrilotetraeddiksyre, 1,2-cykloheksylen-dinitrilotetraeddiksyre, dietylentriamin-pentaeddiksyre, 3,6-dioksa-oktametylendinitrilotetraeddiksyre eller blandinger av disse eller deres alkalimetallsalter. Konsentrasjonen av komplekseringsmidlet holdes mellom 0,001 og 0,5%, fortrinnsvis mellom 0,005 og 0,15% i reaksjonsmediet. Etter endt reaksjon, kan produktet utfelles med et metanoloverskudd og isoleres etter tilsetning av et alkalimetallsalt etter eventuell avkjøling.

Depolymeriseringen av chondroitin-polysulfat med hydrogenperoksyd kan også utføres i nærvær av tungmetallsalter under spesielt milde betingelser. Depolymeriseringen utføres f.eks. på følgende måte: konsentrasjonen av det rå chondroitin-polysulfat kan være 2-35%, fortrinnsvis 15-30%. Konsentrasjonen av hydrogenperoksyd i reaksjonsløsningen kan være 0,5-15%, fortrinnsvis 1-5%. Reaksjonstemperaturen kan ligge i området fra -10°C til +80°C, fortrinnsvis fra 0°C til 30°C. Reaksjonstiden kan strekke seg fra 5 minutter til 24 timer, fortrinnsvis fra 30 til 500 minutter.

pH kan være mellom 3 og 8, fortrinnsvis 4,5-7,5. Tungmetallsalter som har vist seg egnet, er uorganiske og organiske salter av jern, kobolt, kobber, mangan og vanadium. Saltmetallene har fortrinnsvis følgende valenser: jern og kobolt: di- og tri-valent, kobber: mono- og di-valent, mangan: di-, tri-, tetra-, hekso- og hepta-valent, og vanadium: di- og penta-valent. Metallsaltkonsentrasjonen reguleres til mellom 0,001 og 0,5%, for-

trinnsvis mellom 0,05 og 0,2%. Etter nedbrytningen reguleres pH-verdien til området fra 5 til 14, fortrinnsvis fra 6 til 10, hvorpå det depolymeriserte produkt isoleres ved utfelling med metanol.

Det oksydative depolymeriseringstrinn kan utføres ved oksydativ nedbrytning av chondroitin-polysulfat med pereddiksyre i nærvær av visse tungmetallsalter med samme resultat som ved ovennevnte fremgangsmåter. Følgende betingelser har vist seg fordelaktige for gjennomføring av reaksjonen: konsentrasjonen av rå chondroitin-polysulfat kan være 5-35%, fortrinnsvis 10-25%. Konsentrasjonen av pereddiksyre i reaksjonsløsningen kan være 0,1-7%, fortrinnsvis 0,5-2%. Konsentrasjonen av tungmetallsaltet kan ligge i området fra 0,001 til 0,5%, fortrinnsvis 0,005 til 0,2%. Reaksjonstemperaturen kan være -10° til $+90^{\circ}\text{C}$, fortrinnsvis $0-30^{\circ}\text{C}$. Reaksjonstiden kan variere fra 5 minutter til 24 timer, fortrinnsvis fra 15 til 500 minutter. pH-verdien kan være 2-12, fortrinnsvis 3-8.

Reaksjonen skjer med akseptabel hastighet f.eks. med uorganiske eller organiske salter av følgende tungmetaller: jern, kobolt, kobber, mangan og vanadium. Med hensyn til metallenes valens, gjelder det samme som for depolymerisering med hydrogenperoksyd. Det kan være gunstig å stanse depolymeriseringen ved hjelp av et chelateringsmiddel som f.eks. etylendinitrilotetraeddiksyre eller andre metallblokkerende midler, spesielt når det er tale om relativt korte reaksjonstider. Det depolymeriserte chondroitin-polysulfat kan utfelles med metanol, om nødvendig etter tilsetning av et nøytralt salt og regulering av pH til 3-14, fortrinnsvis 6-10.

Rå chondroitin-polysulfater som kan variere betydelig med hensyn til renhet og farge, kan benyttes i foreliggende prosess. På tross av at depolymeriseringen fører til betydelig lysere farge, kan det være nødvendig å inkludere et bleketrinn før videre behandling. Blekingen utføres med pereddiksyre. Følgende betingelser har vist seg fordelaktige: pH-verdien kan variere fra 2,5 til 14, fortrinnsvis fra 3 til 11. Pereddiksyrekonsentrasjonen kan være 0,1-10%, fortrinnsvis 1-5%. Konsentrasjonen av rå chondroitin-polysulfat kan være 2-40%, fortrinnsvis 5-25%. Reaksjonen utføres i temperaturområdet $0-100^{\circ}\text{C}$,

fortrinnsvis 15-70°C. Reaksjonstiden kan være mellom 1 minutt og 96 timer, fortrinnsvis mellom 1 og 24 timer.

I henhold til en foretrukket utførelsesform, kan pereddiksyrebehandlingen inkorporeres i den påfølgende molekylære fraksjoneringsprosess. Som nevnt, kan pereddiksyrebehandlingen også sløyfes.

Molekylvektområdet fra 5.000 til 15.000 utfraksjoneres fra det oppnådde produkt etter bleke- eller depolymeriserings-trinnet ved utfelling med metanol ved forskjellige konsentrasjoner.

I dette trinn kan det depolymeriserte, eventuelt blekede, chondroitin-polysulfat behandles i vandig løsning med metanol i nærvær av et nøytralsalt på følgende måte (den første utfelling med metanol): konsentrasjonen av det depolymeriserte chondroitin-polysulfat i den vandige løsning kan være 5-30%, fortrinnsvis 5-20%. pH-verdien kan ligge i området fra 2 til 10, fortrinnsvis fra 3,0 til 7,5. Nøytralsalt-innholdet kan være 9,5-10%, fortrinnsvis 1-5%. Et foretrukket nøytralsalt er natriumklorid. Temperaturen kan være fra 0 til 50°C, fortrinnsvis fra 15 til 30°C. Metanolkonsentrasjonen kan være 25-45 volumprosent, fortrinnsvis 30-40 volumprosent, i forhold til det totalt behandlede medium. Høymolekulære og høyt sulfaterte chondroitin-polysulfatfraksjoner presipiteres sammen med forurensninger, og kan tas ut ved filtrering eller sentrifugering.

Den metanolholdige løsning som blir igjen, justeres til en metanolkonsentrasjon på 60-85 volumprosent, fortrinnsvis 75-80 volumprosent, i forhold til hele behandlingsmediet, ved ytterligere tilsetning av metanol (2. utfelling med metanol), hvorved et chondroitin-polysulfat-presipitat som de meget lavmolekulære og lav-sulfaterte komponenter kan fjernes fra, oppnås sammen med forurensninger. Disse komponenter utfelles ikke.

Hele fraksjoneringsprosessen med metanol, eller deler av denne, kan erstattes av ultrafiltrering. Det er f.eks. mulig å gjenvinne den samme førstefraksjon som beskrevet ovenfor, ved ultrafiltrering av vandige løsninger av depolymerisert chondroitin-polysulfat med membraner med en eksklusjonsgrense på 6.000 og mer (f.eks. membraner av celluloseacetat, polyamid

eller polysulfon). Konsentrasjonen av chondroitin-polysulfatløsningen kan være 1-10%, fortrinnsvis 1-5%. pH-verdien av løsningen kan være 2-14, fortrinnsvis 5-10. Permeatet kan befris fra lavmolekylære chondroitin-polysulfat-komponenter ved utfelling med metanol som beskrevet ovenfor.

Denne effekt kan også oppnås ved en påfølgende annen ultrafiltrering gjennom membraner med en eksklusjonsgrense på 8.000 og lavere. Konsentrasjonen av chondroitin-polysulfatløsningen kan være 1-10%, fortrinnsvis 1-5%. pH-verdien av løsningen kan være 2-14, fortrinnsvis 5-10.

De eksklusjonsgrenser som er oppgitt av produsentene av ultrafiltreringsmembraner for substanser med en viss molekylarvekt, gjelder i de fleste tilfelle ikke for chondroitin-polysulfater. Egende membraner for hvert enkelt tilfelle må derfor bestemmes eksperimentelt, men erfaring viser at de ligger innenfor de angitte områder.

Fjerningen av salter, eventuelt tungmetallioner og forurensninger oppnås ved behandling med en kation-veksler. Metallionene bindes til ioneveksler-harpiksen i den protonerte form, og den fri mukopolysaccarid-polysvovelsyre havner over i filtratet eller eluatet. Behandlingen kan utføres ved temperaturer fra 0 til 50°C, fortrinnsvis ved romtemperatur. Den kan utføres som batch-prosess ved å røre inn kation-veksleren, eller ved kontinuerlig eller diskontinuerlig kolonneteknikk. Egnede ionevekslerresiner er sterkt sure produkter som f.eks., "Lewatit S 100", "Dowex" X 50 eller "Amberlite" IR 120 i protonert form.

Batch-metoden foretas i vandig løsning med chondroitin-polysulfatkonsentrasjoner på 2-20%, spesielt 5-15%. Mengden av ioneveksler-resin kan utgjøre 2-10 volumdeler, spesielt 3-8 volumdeler pr en vektdel chondroitin-polysulfat-tørresubstans. Fjerningen av salter kan også utføres under de samme betingelser ved å helle ionevekslerne over i kolonner.

Det sterkt sure filtrat eller eluat fra demineraliserings-trinnet utsettes deretter for presipitering ved tilsetning av 2,5-6 volumdeler, fortrinnsvis 3-4 volumdeler, metanol i nærvær av 0,5-5% av et nøytralsalt, spesielt 0,5-3% natriumklorid. Under utfellingen fra et surt medium forblir fri svovelsyre og lavmolekylære chondroitin-polysulfatkomponenter, samt for-

urensninger i løsning. Etter at den utfelte chondroitin-polysvovelsyre er fraskilt, kan den enten represipiteres fra nøytral løsning eller benyttes direkte i det påfølgende prosess-trinn mens den enda er metanol-fuktig.

Demineraliseringen kan sløyfes dersom det er foretatt ultrafiltrering gjennom ultrafiltreringsmembraner med lav eksklusjonsgrense (2. ultrafiltrering), idet det da oppnådde materiale behandles videre.

For å oppnå lysere farve og en spesielt god farvestabilitet under varmesteriliseringen av det rene chondroitin-polysulfat, kan demineraliseringen etterfølges av et ytterligere rensetrinn.

Behandling av chondroitin-polysulfatløsninger med aktivt kull og fullstendig fjerning av adsorbatet, fører til en chondroitin-polysulfatløsning, hvorfra produktet etter justering av pH, utfelles med metanol i nærvær av et nøytralsalt. Konsentrasjonen av den vandige chondroitin-polysulfatløsning som skal behandles, er 5-25%, spesielt 10-20%. pH-verdien av denne er 4-10, spesielt 5-8. Aktivt kull i mengder på 0,1-3 vektdeler pr vektdel chondroitin-polysulfat benyttes. Temperaturen kan være 20-100°C. Behandlingstiden er 10-180 minutter.

Aktivkullet fraskilles, gjerne ved finfiltrering gjennom et membranfilter, for å oppnå en fullstendig kullfri løsning. pH-verdien justeres til 6-10, spesielt 7-8, og sluttproduktet utfelles med metanol i nærvær av et nøytralsalt, f.eks. natriumklorid i en konsentrasjon på 0,5-5%, spesielt 1-2%. Slutt-konsentrasjonen av metanol reguleres til 60-85 volumprosent, fortrinnsvis 75-80 volumprosent. Eksempler på egnede aktive kullkvaliteter er Brilonit normal (Lurgi), rent aktivt kull, katalog nr. 2183 (Merck), rent aktivt kull, pulver, katalog nr. 18003 (Riedel de Haen). Hvorvidt bleking med aktivt kull skal foretas avhenger av det chondroitin-polysulfat som benyttes som utgangsmateriale.

Det kan være fordelaktig å foreta utfellingen av det rensede chondroitin-polysulfat med metanol i nærvær av et kompleksdannende middel og/eller natriumpyrosulfitt. Dette er spesielt gunstig i forbindelse med sluttproduktet, idet det da oppnås injeksjonsløsninger som inneholder chondroitin-poly-

sulfat og er lagringsdyktige uten blakking og med bare ubetydelig mørkere farvenyanse. Eksempler på egnede kompleksdannende midler er nitrilotrieddiksyre, etylendi-nitrilotetraeddiksyre, 1,2-cykloheksylendinitrilotetraeddiksyre, dietylentriamin-pentaeddiksyre og 3,6-dioksa-oktametylen-dinitrilotetraeddiksyre i konsentrasjoner på 0,01-0,5%. Konsentrasjoner på 0,05-0,35% er foretrukket. Konsentrasjonen av natriumpyrosulfitt som kan benyttes under utfellingen med metanol, kan være 0,01-0,5%.

Det beskrevne chondroitin-polysulfat er av terapeutisk betydning innen human- og veterinær-medisinen. Substansen har antikoagulerende, trombolytiske, tromboproylaktiske (spesielt ved dype, venøse tromboser), anti-atherosklerotiske, anti-lipemiske, anti-inflammatoriske, anti-eksudative, anti-artritiske og virus-statiske virkninger.

En karakteristisk ny substans som kjennetegnes ved en forbausende lav toksisitet, oppnås ved den spesielle fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen.

Tabell 1

Akutt toksisitet

Forsøksdyr	Administrering	LD _{50/7d}
NMRI mus	i.v.	>3.500 mg/kg
Wistar rotte	i.v.	>3.000 mg/kg
Katt	i.v.	>1.000 mg/kg
Hund	i.v.	>1.000 mg/kg

Oppfinnelsen angår således også et chondroitin-polysulfat med en akutt toksisitet som ved intravenøs administrering tilsvarende en letaldose på >3.500 mg/kg i NMRI mus, >3.000 mg/kg i Wistar rotter og >1.000 mg/kg i katter og hunder. Et foretrukket produkt i henhold til oppfinnelsen har en akutt toksisitet tilsvarende en letaldose ved intravenøs administrering på >4.000 mg/kg i NMRI mus, >3.500 mg/kg i Wistar rotter, >1.500 mg/kg i katter og >1.000 mg/kg i hunder.

Chondroitin-polysulfater med LD₅₀ (mus, i.v.) på kun 1.000 mg/kg er hittil kjent fra litteraturen. Fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen muliggjør således fremstilling av chondroitin-polysulfat med et betraktelig bredere terapeutisk område.

Chondroitin-polysulfatet fremstillet i henhold til oppfinnelsen, oppviser følgende parametre:

nitrogen:	1,65 - 2,00%
svovel:	12,5 - 14,5 %
heksuron syre:	0,98 - 1,22 mmol/g
heksosamin:	0,96 - 1,24 mmol/g

Forsøk har vist at en enkelt dosering av 20-250 mg, spesielt 30-150 mg pr individualdose å 0,2-2,0 ml, spesielt 0,2-1,0 ml har en terapeutisk og vel tolerabel virkning innen human medisinen. Daglige doser opp til 500 mg viser seg fordelaktige terapeutisk. Injeksjonen kan skje intramuskulært, intra-artikulært, subkutan eller intravenøst selv om man ikke er bundet utelukkende til disse injeksjonsmåter. Terapeutisk egnede løsninger av den virksomme forbindelse kan pakkes, f.eks. i ampuller, bruksklare sprøyter, perforerbare flasker, ampuller for injeksjons-pistoler og annen emballasje egnet for injeksjon. Andre administrasjonsmåter er peroral, perkutan, rektal, sublingval eller bukkal administrering. Den foretrukne dosering tilsvare doseringen ved injeksjon.

Chondroitin-polysulfatet oppnådd i henhold til oppfinnelsen er også egnet innen veterinærmedisinen hvor det også har de beskrevne virkninger. Daglig dosering for hunder er 0,1-5 mg/kg kroppsvekt, fortrinnsvis 0,5-1,5 mg/kg, i et volum på 0,1-10 ml, spesielt 0,5-1,0 ml. Hos hest har f.eks. daglige enkeltdoser på 100-1.000 mg, fortrinnsvis 150-500 mg, i 0,1-20 ml, spesielt 1-5 ml vist seg egnet. Chondroitin polysulfatet kan herunder administreres som i human terapien.

Følgende måte ble benyttet for bestemmelse av den midlere molekylvekt:

En 20 mg prøve ble kromatografert i 2 M natriumklorid-løsning på en Biogel P 10 kolonne (50 g; H = 100 cm, Ø = 2 cm). Chondroitin-polysulfatet påvises i de samlede 10 ml fraksjoner ved heksuronsyrebestemmelse etter metoden beskrevet av Z. Dische: J. Biol. Chem. 167, 189 (1947) modifisert av J. D. Gregory: Arch. Biochem. Biophys. 89, 157 (1960). Chondroitin-polysulfat-fraksjoner hvor molekylvekten er fastslått ved ultrasentrifugering benyttes som referanser. Den midlere molekylvekt beregnes fra det eluatvolum hvor 50% av den totale heksuronsyremengde ifølge kromatogrammet er eluert.

Eksempel 1a (Trinn A)

7,5 kg rått chondroitin-polysulfat (som kan oppnås etter tysk patentskrift 870.094) løses i 75 liter varmt vann og tilsettes 2,25 kg natriumklorid og 2 ml oktan-1-ol. En løsning av 75 g etylendinitrilotetraeddiksyre i 750 ml 1N natriumhydroksyd tilsettes deretter. Blandingen oppvarmes til 95°C og tilsettes under omrøring 7,5 liter 30% hydrogenperoksyd. Temperaturen holdes mellom 90 og 95°C i 100 minutter, hvorpå blandingen raskt avkjøles til romtemperatur.

1,5 kg natriumklorid løses i reaksjonsblandingen og tilsettes 360 liter metanol under omrøring, hvorpå den klare supernatant dekanteres av etter 30 minutter og presipitatet frafiltreres under sug. Det frafiltrerte materiale vaskes med metanol og tørkes ved temperaturer under 60°C. Herved oppnås ca. 7 kg depolymerisert chondroitin-polysulfat.

Eksempel 1b (Trinn A)

7,5 kg rått chondroitin-polysulfat løses i 22,5 liter vann og tilsettes 1,5 kg natriumklorid og deretter en løsning av 37,5 g kobber-(II)-sulfat-pentahydrat i 750 ml vann. 3 liter 30% hydrogenperoksyd tilsettes under kjøling, hvorpå blandingen holdes ved 25°C i 5 timer. Ved hjelp av 30% natriumhydroksydløsning reguleres pH til 10,5, hvorpå utfelling foretas ved tilsetning av 132 liter metanol under omrøring. Supernatanten dekanteres av og presipitatet frafiltreres under sug. Det frafiltrerte materiale vaskes med metanol og tørkes ved temperaturer under 60°C. Ca. 6,8 kg

depolymerisert chondroitin-polysulfat oppnås.

Eksempel 1c (Trinn A)

9 kg rått chondroitin-polysulfat løses i 45 liter vann og tilsettes en løsning av 8,57 g kobolt-(II)-klorid-heksahydrat i 1 liter vann og deretter vann opp til 67 liter. 1,35 liter 40% pereddiksyre tilsettes ved romtemperatur i løpet av 2 timer under kontinuerlig omrøring. En løsning av 27 g dinatrium-etylendinitrilotetra-acetat-dihydrat i 1 liter vann blir deretter tilsatt. pH reguleres nå til 11 med 30% natriumhydroksydløsning, hvorpå 2,2 kg natriumklorid tilsettes og utfelling foretas ved omrøring med 290 liter metanol. Etter 1 time dekanteres supernatanten av, hvorpå presipitatet frafiltreres under sug og materialet på filteret vaskes med metanol og tørkes ved temperaturer under 60°C. Herved oppnås ca. 8,4 kg depolymerisert chondroitin-polysulfat.

Eksempel 2 (Trinn B)

8,0 kg depolymerisert chondroitin-polysulfat løses i 74 liter vann og løsningen blandes med 2 liter 40% pereddiksyre. pH-verdien reguleres til 8 med 30% natriumhydroksyd, og blandingen henstilles i 24 timer ved romtemperatur. 0,4 kg natriumklorid løses i blandingen og utfelling foretas med 320 liter metanol. Presipitatet frafiltreres, vaskes med metanol og tørkes. Ca. 7,9 kg farveløst materiale oppnås.

Eksempel 3a (Trinn C)

6,3 kg depolymerisert chondroitin-polysulfat løses i 27,1 liter varmt vann, tilsettes 3,15 liter 40% pereddiksyre og omrøres, hvorpå blandingen henstilles i 4 timer. 45,4 liter vann tilsettes, hvorpå 2,1 kg natriumklorid løses i blandingen og pH-verdien reguleres til 10,5 med 30% natriumhydroksyd. For å oppnå en metanolkonsentrasjon på 36,5 volumprosent i blandingen, innrøres 0,5748 liter metanol pr liter løsning, d.v.s. i dette tilfelle 48,6 liter metanol. Presipiteringsblanding henstilles over natten, hvorpå supernatanten avdekanteres og det halvflytende presipitat frasentrifugeres. Den klare supernatant som i dette tilfelle utgjør 28,5 liter,

omrøres med 2,175 liter metanol pr liter løsning, d.v.s. 279,5 liter metanol, slik at det oppnås en endelig metanol-konsentrasjon på 80 volumprosent. Presipitatet får anledning til sedimentering i 1 time, hvorpå supernatanten avdekanteres og den gjenværende suspensjon frafiltreres under sug. Presipitatet vaskes med metanol og tørkes ved temperaturer under 60°C. Ca. 5,6 kg mellomprodukt oppnås.

Eksempel 3b (Trinn C)

2 kg depolymerisert chondroitin-polysulfat løses i 200 liter vann og løsningen filtreres gjennom et sterilt filter og blir deretter ultrafiltrert under et trykk på 2,8 bar ved 32°C ved hjelp av en ultrafiltrasjons-presse (membranareal: 2,25 m², eksklusjonsgrense angitt for celluloseacetatmembranen: molekylvekt 15.000). Løsningen pumpes rundt med en strømnings-hastighet på 6,5 m³/time. Når volumet av tilbakeholdt materiale er ca. 20 liter, ultrafiltreres dette 3 ganger etter innblanding av 50 liter vann hver gang.

De samlede permeater ultrafiltreres deretter gjennom en celluloseacetatmembran med en angitt molekylvekt-eksklusjonsgrense på 6.000, men for øvrig under de samme betingelser som ovenfor. Det tilbakeholdte materiale konsentreres ned til en konsentrasjon på 10%, tilsettes natriumklorid opptil en konsentrasjon på 0,5%, hvorpå pH-verdien reguleres til 7,5 og utfelling foretas med 4 volumdeler metanol under omrøring. Etter frafiltrering under sug, blir presipitatet vasket og tørket. Det resulterende mellomprodukt utgjør 1,78 kg.

Eksempel 4a (Trinn D)

5,4 kg av mellomproduktet fra prosesstrinn 3 løses i 54 liter vann, hvorpå 21,6 liter sterkt sur kation-veksler (f.eks. Lewatit S 100) i protonert form røres inn og omrøres ved romtemperatur i 1 time. Kation-veksleren frafiltreres under sug og renses med to 8,1 liters porsjoner vann, og filtratene kombineres. 2,19 kg natriumklorid tilsettes til filtratet og utfelling foretas under omrøring med 292 liter metanol. Etter henstand over natten, avdekanteres supernatanten og den gjenværende suspensjon filtreres under sug, hvorpå det

fracfiltrerte materiale vaskes grundig med metanol. Presipitatet løses i 43,2 liter vann, pH reguleres til 7,5 med 30% natriumhydroksyd, tilsettes 700 g natriumklorid og utfelles under omrøring med 139,2 liter metanol. Den klare supernatant avdekanteres og den gjenværende suspensjon filtreres gjennom et undertrykks-filter, hvorpå materialet på filteret vaskes med metanol. Etter tørking oppnås 3,6 kg demineralisert chondroitin-polysulfat.

Eksempel 4b (Trinn D)

9 kg av mellomproduktet oppnådd etter prosesstrinnet, eller det fortsatt metanol-fuktige presipitat fra dette trinn, løses i vann slik at det oppnås 90 liter løsning. Løsningen sendes gjennom en ione-vekslersøyle fylt med 36 liter kation-veksler Amberlite IR 120 på H^+ form. Forholdet mellom fyllhøyde og diameter er f.eks. ca. 2,5:1. Etter at løsningen har rent gjennom, renses kolonnen med 33,3 liter vann. 3,7 kg natriumklorid tilsettes til de samlede substansholdige filtrater, og utfelling foretas ved tilsetning av 492 liter metanol. Presipitatet fracfiltreres under sug og vaskes med metanol, hvorpå det fremdeles løsningsmiddel-fuktige presipitat løses i pyrogen-fritt vann til et totalvolum på 72 liter. 1,15 kg natriumklorid tilsettes, pH-verdien reguleres til 7,5 med 30% natriumhydroksyd, hvorpå utfelling skjer ved tilsetning av 219 liter metanol. Presipitatet fracfiltreres med sug, vaskes med metanol og tørkes. Ca. 6 kg demineralisert chondroitin-polysulfat oppnås.

Eksempel 5 (Trinn E)

20 kg demineralisert chondroitin-polysulfat løses i 190 liter pyrogen-fritt vann. Løsningen oppvarmes til 90°C og tilsettes 40 kg aktivt kull (Riedel de Haen nr. 18003). Temperaturen holdes ved 90°C i 60 minutter, hvorefter blandingen filtreres i varm tilstand ved bruk av trykkfilter. Kullresiduet vaskes to ganger med 40 liters porsjoner pyrogen-fritt vann og filtratene slås sammen. 3 kg natriumklorid og 660 g dinatrium-etylendinitrilotetra-acetat-dihydrat tilsettes. pH-verdien reguleres til 7,5. Blandingens filtreres deretter gjennom et vasket membranfilter (porediameter: 0,2 μm). Den

fullstendig klare løsning underkastes utfelling under omrøring med 720 liter metanol. Presipitatet frafiltreres med sug, vaskes med metanol og tørkes ved temperaturer under 50°C. Her ved oppnås ca. 18 kg farveløst, fin-partiklet, rent, injiserbart chondroitin polysulfat. Kjemisk analyse ga følgende verdier:

N: 1,77%

S: 12,96%

heksuronsyre: 1,08 mmol/g

heksosamin: 1,12 mmol/g

Eksempel 6 (Fremstilling av en injeksjonsløsning)

3,25 kg beregnet på basis av vannfritt materiale, rent chondroitin-polysulfat og 0,325 kg natriumklorid løses under omrøring i ca. 50 liter aqua pro iniectabilia, og løsningen fylles opp til 65 liter. Etter regulering av pH-verdien til 8,4 med 1N natriumhydroksyd og steril filtrering gjennom et membranfilter, fylles løsningen over i ampuller under sterile betingelser etter kjent teknikk. De forseglede ampuller utsettes for varmebehandling i kokende vannbad i 60 minutter.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåte ved fremstilling av et injiserbart chondroitin-polysulfat, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

- a) rått chondroitin-polysulfat depolymeriseres oksydativt,
- b) det depolymeriserte chondroitin-polysulfatet blekes, om nødvendig, med pereddiksyre,
- c) fra produktet som erholdes fra trinn a eller b isoleres en bestemt fraksjon med hensyn på molekylvekten ved å fjerne materialet med høyere molekylvekt ved metanolutfelling under anvendelse av 25-45 % metanol av blandingens hele volum eller ultrafiltrering under anvendelse av en filtreringsmembran med en ekskluderingsgrense på minst 6000, og skille materialet som hører til fraksjonen fra materialet med lavere molekylvekt med en andre metanolutfelling under anvendelse av 60-85 % metanol av blandingens hele volum, eller med en andre ultrafiltrering under anvendelse av et filtreringsmedium med en ekskluderingsgrense på maksimalt 8000,
- d) produktene som erholdes etter c demineraliseres, om nødvendig, med kationbytter, og
- e) produktene som oppnås etter c og d avfarges, om nødvendig, med aktivt kull.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den oksydativ depolymerisering A utføres med hydrogenperoksyd uten nærvær av tungmetaller.

3. Fremgangsmåte som angitt i krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den utføres i nærvær av et kompleksdannende middel.

4. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
karakterisert ved at den oksydative
depolymerisering A utføres med hydrogenperoksyd i nærvær av
salter av jern, kobolt, kobber, mangan og/eller vanadium.

5. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
karakterisert ved at den oksydative depolymer-
isering A utføres med pereddiksyre i nærvær av salter av jern,
kobolt og/eller mangan.

6. Fremgangsmåte som angitt i kravene 4 og 5,
karakterisert ved at konsentrasjonen av
tungmetallsaltene i reaksjonsmediet holdes mellom 0,001 og
0,5 % (vekt/volum).

7. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
karakterisert ved at pereddiksyrebehandlingen
B inkorporeres i molekylar-fraksjoneringsprosessen C.

8. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
karakterisert ved at det rene chondroitin-
polysulfat utfellesses med metanol i nærvær av 0,01-0,5 % av et
kompleksdannende middel.

9. Fremgangsmåte som angitt i kravene 1 og 8,
karakterisert ved at det rensede chondroitin-
polysulfat utfellesses med metanol i nærvær av 0,01-0,5 % natrium-
pyrosulfitt.