

(19) **DANMARK**



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT**

(11) **161973 B**

(21) Patentansøgning nr.: **0640/78**

(51) Int.Cl.⁵

C 08 B 37/08

(22) Indleveringsdag: **13 feb 1978**

(41) Alm. tilgængelig: **15 aug 1978**

(44) Fremlagt: **02 sep 1991**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **14 feb 1977 IT 20261/77**

(71) Ansøger: ***MEDIOLANUM FARMACEUTICI S.R.L.; Via San Giuseppe Cottolengo; 31; Milano, IT**

(72) Opfinder: **Gianfranco *Fedeli; IT**

(74) Fuldmægtig: **Hofman-Bang & Boutard A/S**

(54) **Fremgangsmåde til udvinding af et arterielt polysaccharidkompleks fra unge pattedyrs aorta**

(56) Fremdragne publikationer

DK 161973 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til udvinding af et arterielt polysaccharidkompleks, FAPA, med anion-karakter, bestående af hexosamin-glycanmonosulfater fra unge pattedyrs aorta.

5

Talrige lægemidler er i de senere år blevet foreslået til at genoprette normale koncentrationer af de forskellige lipidbestanddele i serum, under hensyntagen til den særlige alvorlige virkning af hyper- og dyslipidämier i talrige sygdomstilstandes etiologi, herunder sygdomme af samfundsmæssig betydning.

10

Disse lægemidler kan efter deres virkemåde opdeles skematisk som følger:

15

1) sådanne, som inhiberer kolesterol-absorptionen i tarmsystemet

2) sådanne, som influerer på udskillelsen af galdesyre

20

3) sådanne, som inhiberer kolesterol-syntesen samt fedtvævet fede syres bevægelighed

4) sådanne, som udløser fibronolyse og thrombolyse

25

5) sådanne, som fremmer forøgelsen i bortskaffelsen af lipoproteiner.

30

Blandt disse sidstnævnte lægemidler har heparin og analoge forbindelser i almindelighed betegnet som heparinoider fået særlig betydning ved behandlingen af hyper- og dyslipidämier.

35

Blandt heparinets forskellige farmakologiske virkninger er af særlig betydning den såkaldte opklarende virkning, som i princippet består af fremkaldelse i blodstrømmen af lipoproteinlipase, som er et fysiologisk enzym, som spal-

ter ester-bindingerne i triglycerider og omdanner disse til monoglycerider og frie fedtsyrer. Denne virkning er fuldstændig uafhængig af den anti-koagulerende virkning, som udgør den negative side ved heparinanvendelsen, og
5 som betinger grænsen for anvendelsen af heparin til denne type behandling.

Inden for området anti-arteriosclerosebehandling er det på den anden side blevet anført i litteraturen (Comi et
10 al. - Boll. Chim. Farm. 106/5/309/21 (1967); Fransk patentskrift M 4871 dateret 24. Nov. 1965), at man ved at indgive hele aorta-ekstrakter til kaniner, som er blevet gjort hypercholesterolæmiske ved hjælp af kolesterol-baseret diæt, kan opnå en kraftig reduktion i atheroma-
15 tose-dannelsen. Men her overfor er det blevet vist (Dall'Occhi et al. Adv. Exi. Med. Biol. 1967 1468/83), at hel aorta-ekstrakt fører til immunitets-reaktioner, som har skadelig virkning på lungearterierne.

Det har nu vist sig, at det er muligt fra unge pattedyrs aorta at ekstrahere et specifikt polysaccharid-kompleks med anion-karakter, bestående af hexosamin-glycanmonosulfater. Dette kompleks har overraskende vist sig i besiddelse af anti-arteriosclerotiske egenskaber samtidig med
20 en komplet mangel på bivirkninger.

Dette hidtil ukendte kompleks, som for nemheds skyld i det følgende vil blive betegnet med bogstaverne FAPA (Arterielt Anti-arteriosclerotisk Polysaccharid Faktor),
30 er entydigt karakteriseret ved følgende fysisk-kemiske egenskaber:

a) ved hydrolyse frigør det hexosamin, uronsyrer og sulfater i det omtrentlige molforhold 1/1/1 sammen med
35 variable mængder af nukleosider.

5 - hexosamin (glucosamin): specifik colorimetrisk reaktion mellem amin i hexoser og p-dimethylaminobenzaldehyd = 30+2%

10

15

- Na: bestemt ved atomabsorption (ikke rutine) = 10_±2%

elektroforetisk adskiller det sig i tre anion-bånd, der kan markeres med alcian blau og toluidinblåt.

20

25

30

35

lige i vand, hvorimod de salte, som det danner med alifatiske ammoniumioner, er uopløselige

5 d) natriumsaltet er 2% opløselig i 50% ethylalkohol, mens syreformen er 2% opløselig i 70% ethylalkohol

e) det reagerer med toluidinblåt og giver minimal meta-kromatisk reaktion (ca. 1/10 af den med heparin fremkomne)

10

f) spektrophotometrisk udviser det et maksimum ved 260 ± 1 nm

15

g) det udviser rotation af polariseret lys på fra -11° til -22°

h) kompleksets IR-spektrum bestemt i KBr, som er vist i den på fig. 1 anførte kurve, viser tilstedeværelsen af følgende grupper:

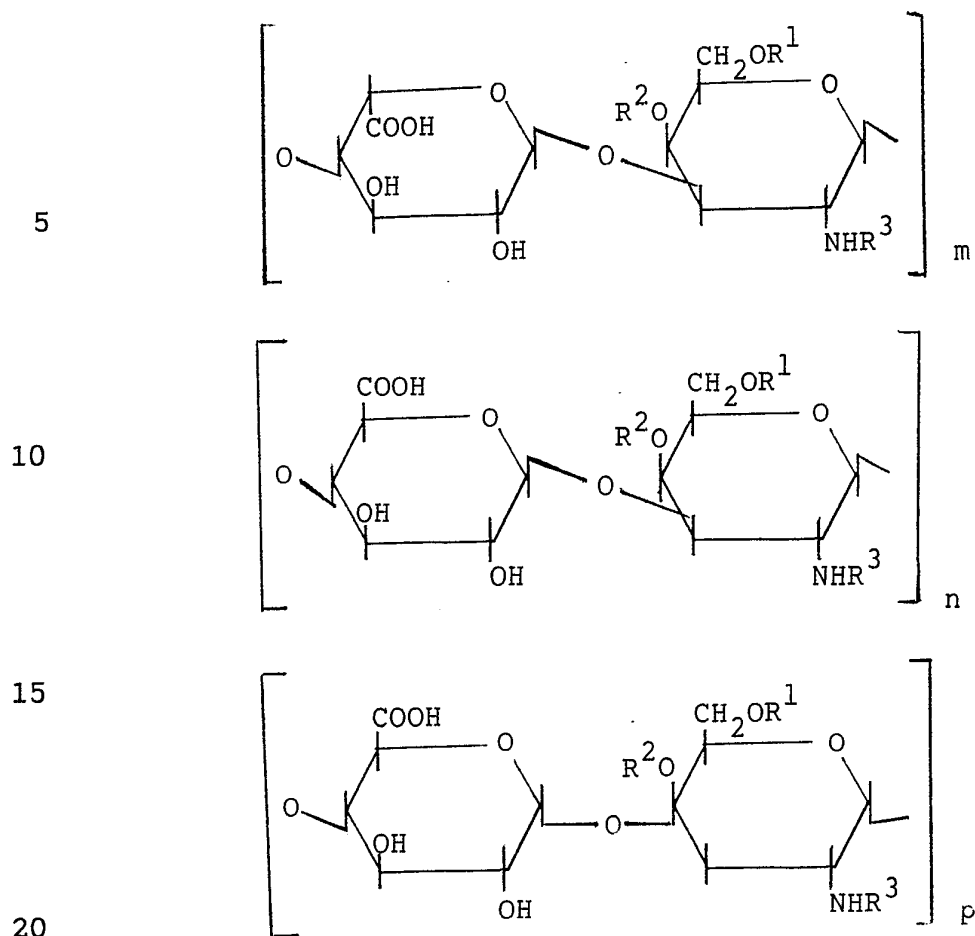
20

- COOH
- NHR
- COCH₃
- OSO₃H
- 25 - CH₂OH

Ud fra de samlede analytiske data kan man fastslå, at FAPA besidder en struktur af følgende type:

30

35



25 hvori R¹ og R² er -H eller -SO₃H, R³ er -SO₃H eller -CO-CH₃, og m, n, p er hele tal, som kan variere inden for meget vide rammer og fører til molekylvægte på fra 10 000 til 30 000 dalton for polysaccharid-kæderne.

30 Disse karakteristika og ganske særlig molforholdene af de ved hydrolyse opståede komponenter viser, at FAPA kan beskrives kemisk som et molekylær-kompleks bestående af hexoaminglycanmonosulfater (chondroitin-sulfaterne B og C og heparitin-sulfater, som de findes i arterievægge).

35 Fremgangsmåden til udvinding af FAPA ifølge den foreliggende opfindelse er ejendommelig ved, at udvindingen sker på den i den kendetegnende del af krav 1 angivne måde.

FAPA kan på denne måde isoleres i ren tilstand på saltform og i højt udbytte.

5 Oprensningen ved saltdannelse sker med alkalimetall eller
alkaliske jordarters metalbaser, idet man f.eks. fore-
tager en blegning med permanganat, behandling med alkali
ved 70 °C til fjernelse af terminal-grupperne af de til-
bageblevne peptid-kæder, udskillelse af den ønskede salt-
10 form med opløsningsmidler (natrium, kalium, calciumsalte
osv.), filtrering, sterilisering og frysetørring.

FAPA er blevet undersøgt med hensyn til sine farmakolo-
giske egenskaber i sammenligning med visse anti-arterio-
sclerotiske præparater af ovennævnte type; den er særlig
15 blevet undersøgt i sammenligning med heparin, der er det
opklarende lægemiddel mod antonomasi, og med hel aorta-
ekstrakt.

Følgende grundlæggende karakteristika blev fastlagt ved
20 in vivo afprøvning:

1. Virkning på eksperimentel fremkaldt arteriosclerose

25 Denne undersøgelse blev udført på kaniner opdelt i hold
på 5 dyr til behandlingerne og fodret med en kolesterol-
rig blandet diæt.

30 Dyrenes blod blev analyseret til bestemmelse af for-
estrede fedtsyrer (EFA), totalcholesterol, β -lipoprote-
iner samt koagulationstid. Cholesterolindholdet i væv fra
aorta blev målt, samtidig med at forekomsten af atheromer
blev observeret.

35 I tabel 1 er sammenfattet de opnåede resultater ved an-
vendelse af FAPA, heparin samt hel aortaekstrakt efter 40
dages behandling.

Tabel 1

	EFA mg/100 ml serum	Cholesterol mg/100 ml serum	β -lipoproteiner mg/100 ml serum	Koag. tid log minutter	aorta-cholesterol mg/100 g tørstof	atheromer
Kontrolldyr	456 $\pm$ 14	215 $\pm$ 19	78 $\pm$ 4	0,78 $\pm$ 0,06	2,85 $\pm$ 0,12	++++
FAPA 1 mg/kg	180 $\pm$ 5	90 $\pm$ 15	40 $\pm$ 2,5	0,81 $\pm$ 0,04	1,98 $\pm$ 0,08	++
FAPA 10 mg/kg	162 $\pm$ 8	76 $\pm$ 13	35 $\pm$ 13	0,9 $\pm$ 0,04	1,7 $\pm$ 0,04	+
Heparin 10 mg/kg	171 $\pm$ 11	78 $\pm$ 13	38 $\pm$ 1	1,9 $\pm$ 0,4	2 $\pm$ 0,05	+
Heparin 10 mg/kg	138 $\pm$ 8	76 $\pm$ 15	30 $\pm$ 2	2,3 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,03	+
Hel aorta ekstrakt 1 mg/kg	430 $\pm$ 14	190 $\pm$ 14	79 $\pm$ 3	0,75 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,2	++++
Hel aorta ekstrakt 10 mg/ kg	218 $\pm$ 4	97 $\pm$ 1	36 $\pm$ 4	0,78 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,04	++

++++ = udpræget forekomst af atheromer med hensyn til antal og udstrækning

++ = ca. 50% af forekomsten hos kontrolldyr

+ = forekomst omtrent lig med forekomsten hos normale kaniner

DK 161973 B

2. Biologisk virkning

De forhold vedrørende biologisk virkning, der blev bestemt var antikoagulationsvirkning (i overensstemmelse med USP) samt opklaringsvirkningen på rotter (Morton Grosman metode J.Lab. and Clin. Med. Marts 1954, side 445). Med hensyn til sidstnævnte bestemmelse blev der ved den foreliggende afprøvning indført modifikationer, som tillod virkningen at blive udtrykt i internationale lipasæmiske enheder (ULI) i overensstemmelse med UIB-definitionen (International Biochemical Union), ifølge hvilket en international enhed (ULI) er lig med den virkning, som omdanner substratet med en hastighed på 1 mikromol pr. minut.

Resultaterne vedrørende biologisk virkning af FAPA er vist i tabel 2 i sammenligning med heparin og aortaekstrakt.

Tabel 2

	Heparin	Aorta- ekstrakt	FAPA
25 Antikoagulationsvirkning (USP/mg)	135-148	ca. 0,5	5-15
30 Opklaringsvirkning (ULI/l plasma) ved dosering på 0,5 mg/kg	480±100	15±7	270±80

3. Tolerance over for forbindelsen

5 A) Toxicitet: FAPA viste sig at være godt tolereret af rotter, kaniner og marsvin behandlet enten ved parenteral indgift eller ved peroral indgift med daglige doser på 200 mg/kg.

10 B) Immunologiske afprøvninger: Hos marsvin behandlet med FAPA førte immunologiske afprøvninger for antistof og anafylaktisk fremkaldelse ikke til nogen antistof- eller anafylaktisk respons.

15 C) Vasokinetiske undersøgelser: Der blev ikke konstateret nogen virkning, hverken af histamin- eller af adrenalintyperne, selv med doseringer på 50 mg/kg.

20 Samtlige oven anførte afprøvninger viser, at FAPA kan vælges som lægemiddel til anti-arteriosclerotisk anvendelse, eftersom dets virkning er af samme størrelsesorden som heparins, mens den ikke giver anledning til risiko for blødning, således som det er typisk for sidstnævnte forbindelse.

25 Den biologiske virkning af FAPA er yderligere ca. 10 gange større end den biologiske virkning af hel aortaekstrakt, men uden dennes immunoreaktive bivirkninger, og det frembyder således betydelig fordel med hensyn til doseringsteknik samt risikoen for udvikling af overfølsomhed under behandlingen.

30 I det følgende anføres nogle praktiske eksempler på fremstillingen af det hidtil ukendte arterielle polysaccharid-kompleks ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 1

50 kg kalveaorta blev fint formalet og homogeniseret i 66 l vand. Efter langsom opvarmning af blandingen til 50 °C, blev tilsat 0,6 kg papain forud bragt i suspension i 9 l vand indeholdende 10 g natriummetabisulfit som bakteriostatisk middel.

Den samlede blanding blev opvarmet til 65 °C og holdt under disse betingelser i 3 timer, idet man drog omsorg for, at pH ikke sank under 6 ved passende tilsætning af alkali. Efter forløbet af dette tidsrum blev blandingen opvarmet til 95 °C i 15 minutter.

Efter henstand i 30 minutter blev blandingen filtreret gennem filterklæde, forud belagt med filterjord.

0,6 kg cetyltrimethylammoniumchlorid opløst i 35 l vand blev sat til filtratet.

Efter henstand natten over blev det øverste væskelag fjernet med hævert. Bundfaldet blev fraskilt ved filtrering og opløst i 25 l vand indeholdende 3 kg natriumchlorid ved opvarmning til 70 °C. Denne opløsning blev gjort klar ved filtrering. Filtratet blev behandlet med et lige så stort rumfang acetone. Bundfaldet, som bestod af det grå natriumsalt af FAPA, blev vasket flere gange med 70 °C acetone og derpå tørret. På denne måde udvandt man 85 g råt natriumsalt af FAPA.

Dette bundfald blev vasket med 1500 ml vand, dets pH blev derpå justeret til 8, og det blev derpå behandlet med 1,5 g kaliumpermanganat, og gradvist opvarmet til 90 °C. Det blev filtreret for at fjerne det dannede bundfald. Filtratets pH blev justeret til 11 med natriumhydroxid og holdt ved 70 °C gennem 10 timer.

Efter at denne tid var forløbet, blev væsken nedkølet, dens pH justeret til 7 med saltsyre, og den filtreredes gennem en membran på 0,8 μm . Den således dannede væske blev behandlet med 2 rumfang ethylalkohol. Efter 2 timers
5 henstand blev det dannede bundfald frasepareret ved filtrering og vasket med 500 ml 75% alkohol.

Bundfaldet blev opløst i 800 ml vand og inddampet, indtil den resterende alkohol var fjernet.

10 Koncentratet blev filtreret gennem en membran på 0,2 μm , og det klare filtrat blev frysetørret.

På denne måde udvandt man 42 g af natriumsaltet af FAPA,
15 der udviste følgende karakteristika:

	uronsyre	35%
	hexosamin	30,5%
	NaSO_3	18,1%
20	nukleosider	5,2%
	uorganiske salte	8% (hovedsagelig chlorider)
	opklaringsvirkning	210 ± 20 ULI/l
	antikoagulationsvirkning	6 UI/mg

25 EKSEMPEL 2

50 kg svineaorta blev behandlet analogt med fremgangsmåden i eksempel 1. Man udvandt 36 g natriumsalt af FAPA, som udviste fysisk-kemiske karakteristika, der var helt
30 analoge med de i foregående eksempel anførte, og som havde en opklaringsvirkning på 180 ± 30 ULI/l.

EKSEMPEL 3

35 50 kg kalveaorta blev nedbrudt med ficin i stedet for med papain, og fremgangsmåden blev derpå fortsat analogt med eksempel 1. Udbyttet var 35 g natriumsalt af FAPA, der

udviste fysisk-kemiske karakteristika helt analoge med de i eks. I beskrevne, og som havde en opklaringsvirkning på 280 ± 40 ULI/l.

5 EKSEMPEL 4

50 kg kalveaorta blev homogeniseret i 150 l vand og nedbrudt med 2 kg pankreatin ved pH 8 og 40 °C gennem 24 timer i nærvær af toluen som bakteriostatisk middel.

10

Efter filtrering blev den klare væske blandet med 3 rumfang acetone. Det således dannede bundfald blev hydrolyseret med alkali ved pH 11 og 70 °C gennem 15 timer. Efter filtrering blev væsken behandlet med 400 g cetylpyridiniumchlorid, hvilke førte til det tilsvarende uopløselige kvaternære ammoniumsalt af FAPA.

15

Bundfaldet blev derpå opløst i 1500 ml vand indeholdende 90 g calciumchlorid. Efter filtrering blev væsken behandlet ved pH 8 med 1 g kaliumpermanganat, opvarmet til 90 °C, og filtreret. Filtratet blev dialyseret i 15 timer mod en vandstrøm til bortfjernelse af overskud af saltene, og blev derpå filtreret gennem en membran på 0,45 µm samt frysetørret.

20

25

På denne måde udvandt man 35,5 g af calciumsaltet af FAPA, der udviste fysisk-kemiske karakteristika helt analoge med de i eksempel 1 beskrevne, og som havde en opklaringsvirkning på 315 ± 30 ULI/l.

30

35

P a t e n t k r a v :

5 Fremgangsmåde til udvinding af et arterielt polysaccharid-kompleks, FAPA, med anion-karakter, bestående af hexosamin-glycanmonosulfater, fra unge pattedyrs aorta, k e n d e t e g n e t ved, at udvindingen sker ved følgende bearbejdningstrin:

- 10 1) unge pattedyrs aorta fjernes og formales umiddelbart efter slagtningen,
- 2) den formalede masse homogeniseres, suspenderes i vand eller en saltopløsning,
- 15 3) suspensionen bruges til at reagere med proteolytiske enzymer, såsom trypsin, chymotrypsin, pancreatin, papain, ficin eller bromelin under deres respektive, optimale pH-, temperatur- og reaktionstidsbetingelser,
- 20 4) væsken fra den således behandlede suspension frasepareres ved filtrering og opsamles,
- 5) det nævnte filtrat behandles med vand-blandbare opløsningsmidler og/eller med ammoniumsalte til udfældning af polysaccharid-komplekset FAPA i form af hexosamin-glycanmonosulfater med anionkarakter eller uopløselige quaternære ammoniumsalte deraf, og
- 25 6) det udfældede FAPA opløses i vand og omdannes til et alkalimetal- eller jordalkalimetalsalt, som skilles fra den vandholdige opløsning i ren tilstand på i og for sig kendt måde.

DK 161973 B

