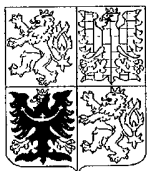


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.03.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.03.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/0420**
(33) Země priority: **DK**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.04.2001**
(Věstník č. 4/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/DK99/00160**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/48533**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3535

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 47/48

A 61 K 33/26

A 61 P 7/06

(71) Přihlašovatel:
PHARMACOSMOS HOLDING A/S, Roskilde, DK;

(72) Původce:
Andreasen Hans Berg, Viby Sjaelland, DK;
Christensen Lars, Roskilde, DK;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Sloučenina železa a dextranu

(57) Anotace:

Řešení se týká sloučeniny pro parentrální léčení anemie s nedostatkem železa, kterýžto sloučenina obsahuje hydrogenovaný dextran ve stálé asociaci s oxyhydroxidem železitým. hydrogenovaný dextran má hmotnostní střední molekulovou hmotnost mezi 700 a 1 400 (0,7 a 1,4 kg.mol⁻¹), s výhodnou 1 000 (1 kg.mol⁻¹) a číselnou střední molekulovou hmotnost od 400 do 1 400 (0,4 - 1,4 kg.mol⁻¹), kde 90 hmotnostních % dextranu má molekulové hmotnosti menší než 2 700 (2,7 kg.mol⁻¹) a hmotnostní střední molekulovou hmotnost 10 hmotnostních % podílu dextranu s nejvyššími molekulovými hmotnostmi činí méně než 3 200 (3,2 kg.mol⁻¹), přičemž uvedený hydrogenovaný dextran byl podroben čištění membránovými postupy s vylučovací hranicí 340 a 800 (0,3 a 0,8 kg.mol⁻¹). Sloučenina se vyrábí za použití membránových postupů k odstranění dextranů o vyšší molekulové hmotnosti než přibližně 2 700 (2,7 kg.mol⁻¹) a membránových postupů k odstranění cukrů o molekulové hmotnosti nižší než přibližně 340 (0,34 kg.mol⁻¹) z hydrogenovaného dextranu před srážením hydroxidu železitého v přítomnosti uvedeného dextranu s následným zahřátím a čištěním.

Sloučenina železa a dextranu

Oblast techniky

Sloučenina železa a dextranu pro použití jako složka léčebného prostředku pro profylaxi nebo léčení nedostatku železa, způsob výroby uvedené sloučeniny železa a dextranu a použití uvedené sloučeniny pro přípravu léčebného prostředku, který je možno podávat parenterálně.

Dosavadní stav techniky

Anemie s nedostatkem železa byla popsána jako jeden z nejobvyklejších - a možná nejobvyklejší - patologický stav člověka z celosvětového hlediska. Pokud nejsou přijata vhodná profylaktická opatření, je anemie s nedostatkem železa problémem i v moderním chovu vepřů a jiných domácích zvířat.

Ačkoliv lze anemii s nedostatkem železa předcházet nebo ji léčit orálním podáním přípravků obsahujících železo, dává se v řadě případů přednost použití železitých přípravků podávaných parenterálně, aby se předešlo poměnlivosti v biologické dostupnosti při orálním podání a aby bylo zajištěno účinné podání.

Z těchto důvodů byly parenterální přípravky s obsahem železa, to znamená pro podkožní, nitrosvalové a nitrožiní podání, již po mnoho let k dispozici veterinárním a humánním praktickým lékařům.

Ačkoliv byly jako složky parenterálně podávaných léčiv proti anemii s nedostatkem železa navrženy nebo použity různé

sloučeniny, obsahující železo, jsou dnes nejobvyklejšími přípravky ty, které obsahují oxyhydroxid (nebo hydroxid) železitý ve spojení s dextranem. Dextran je polymerní cukr, vytvářený mikroorganizmem *Leuconostoc mesenteroides*.

Přípravek se železem pro parenterální injekci musí pochopitelně vyhovovat řadě požadavků včetně dobré dostupnosti železa pro syntézu hemoglobinu, působení bez místních a všeobecných vedlejších účinků a stálosti při uchovávání, která umožňuje dostatečnou skladovatelnost při teplotě místnosti.

Přípravky železa s dextranem pro léčení anemie jsou na trhu po desítky let; s cílem zlepšit stálost těchto přípravků a snížit rozsah vedlejších účinků po jejich podání bylo navrženo mnoho změn ve způsobu výroby a ve výběru výchozích látek.

Jako příklady patentů, zabývajících se těmito problémy, je možno uvést následovné:

US 2 885 393 (1959) popisuje základní postup přípravy komplexu železa s dextranem, ve kterém je střední molekulová hmotnost dextranu 30 000 až 80 000 Daltonů ($30-80 \text{ kg.mol}^{-1}$) nebo nižší. Z údajů v patentu nevyplývá, zda jsou tyto komplexy vhodné pro léčbu lidí.

US Re. 24 642 (1959) obsahuje v zařazených odkazech podrobný rozbor požadavků na roztok obsahující železo, určený k nitrosvalové injekci. Patent pojednává o vcelku neiontovém komplexu hydroxidu železitého s dextranem o průměrné vnitřní viskozitě při 25°C od přibližně 0,025 do přibližně 0,25 a

dále o způsobu přípravy takového komplexu tím, že se popsany dextran spojí s hydroxidem železitým, vytvořeným *in situ* reakcí mezi železitou solí a alkalickou zásadou. Nejsou uvedeny žádné údaje o požadované molekulové hmotnosti dextranu a kromě částečné depolymerace není naznačena ani žádná chemická změna dextranu.

US 3 093 545 (1963). Tento patent uvádí některé podrobnosti, jako je teplota a hodnoty pH, při zdokonalené výrobě látky, zřejmě velmi podobné té, která byla připravena podle předchozího patentu.

GB 1 200 902 (1970) uvádí, že na rozdíl od výroby hydroxidu železitého *in situ* je výhodné předem vytvořit hydroxid železitý za kontrolovaných podmínek, neboť takový hydroxid železitý vytváří ochotně komplexy s dextranem. Dále se uvádí, že jako teoretické možnosti přicházejí v úvahu nejenom částečně depolymerované dextrany se střední molekulovou hmotností v rozsahu např. 500 - 50 000 Daltonů ($0,5-50 \text{ kg.mol}^{-1}$), s výhodou v rozsahu 1 000 - 10 000 Daltonů ($1-10 \text{ kg.mol}^{-1}$), ale také pozměněné formy nebo deriváty dextranu, jako jsou hydrogenované dextrany nebo oxidované dextrany nebo dextrany, na které bylo působeno zásadami. Jediné dextrany, které jsou jmenovitě uvedeny, jsou oxidované dextrany se střední molekulovou hmotností 3 000, resp. 5 000 Daltonů ($3-5 \text{ kg.mol}^{-1}$). Hydroxid železitý se připravuje před stykem s dextranem. To znamená, že výsledná látka sestává z oxyhydroxidu železitého, na kterém dextran vytváří povlak na rozdíl od homogenějších výrobků, vytvořených srážením hydroxidu železitého *in situ*, t.zn. v přítomnosti dextranu.

DK 117 730 (1970) se zabývá postupem, ve kterém reaguje hydrogenovaný dextran o molekulové hmotnosti mezi 2 000 a 10 000 Daltony ($2-10 \text{ kg.mol}^{-1}$) s hydroxidem železitým ve vodném prostředí. Průměrná molekulová hmotnost dextransu, použitého v příkladech provedení vynálezu, není uvedena. Jako vnitřní viskozita se však uvádí hodnota 0,05, což by odpovídalo střední molekulové hmotnosti přibližně 5 000 Daltonů (5 kg.mol^{-1}).

DK 122 398 (1972) rovněž popisuje použití hydrogenovaného dextransu pro přípravu komplexních sloučenin s hydroxidem železitým a uvádí, že se dosahuje podstatně nižší toxicity, než při použití nehydrogenovaného dextransu. Předmětem patentu je způsob výroby, při kterém se vlhký hydroxid železitý smísí se suchým hydrogenovaným dextransem a po případném přidání kyseliny citronové nebo citrátu se směs zahřeje a čistí.

US 3 697 502 (1972) uvádí způsob výroby přípravku železa s dextransem, ve kterém se k dextransu přidá kyselina citronová a současně i roztok hydroxidu alkalického kovu a roztok chloridu železitého. Střední molekulová hmotnost dextransu je mezi 3 000 a 20 000 Daltonů ($3-20 \text{ kg.mol}^{-1}$). Dextrans, použitý v příkladech provedení vynálezu, má molekulovou hmotnost 7 000 a 10 000 Daltonů ($7 \text{ a } 10 \text{ kg.mol}^{-1}$).

DK 129 353 (1974) je zaměřen na podobný způsob výroby derivátu hydroxidu železitého s dextransem s průměrnou molekulovou hmotností dextransu nejvýše 50 000 Daltonů (50 kg.mol^{-1}), přičemž koncové skupiny jeho polymerního řetězce byly pozměněny tak, že koncové jednotky anhydroglukosy redukční povahy byly přeměněny na příslušné karboxylové

kyseliny. Ačkoliv rozsah molekulových hmotností, uvedený pro dextran, je velmi široký - od 500 do 50 000 Daltonů ($0,5-50 \text{ kg.mol}^{-1}$), s výhodou od 1 000 do 10 000 Daltonů ($1-10 \text{ kg.mol}^{-1}$) - má jediný dextran, uvedený v příkladu, střední molekulovou hmotnost 5 000 Daltonů (5 kg.mol^{-1}).

DK 129 942 (1974) se podobá předchozímu dánskému patentu a pojednává o přípravě komplexů hydroxidu železitého s dextranheptonovou kyselinou nebo dextrinheptonovou kyselinou. Heptonové kyseliny se připravují hydrolýzou příslušných kyanhydrinů.

US 4 827 945 (1989) a 5 102 652 (1992) se oba zabývají superparamagnetickými kovovými oxidy, potaženými polymerními látkami jako je dextran, nebo s nimi asociovanými. Polymer se uvede do styku se směsí kovových oxidů ve dvou různých oxidačních stupních k vytvoření kombinované superparamagnetické látky, která se dodatečně oxiduje tak, aby se veškerý kovový oxid přeměnil na nejvyšší oxidační stupeň. Vzniklá látka je zvláště užitečná v lékařské diagnostice jako kontrastní látka při zobrazování magnetickou rezonancí. Zmíněna je však také možnost jejich využití v léčbě anemie s nedostatkem železa. Molekulová hmotnost polymerů, včetně cukrů jako je dextran, je s výhodou od 5 000 do 250 000 Daltonů ($5-250 \text{ kg.mol}^{-1}$).

GB 1 076 219 popisuje výrobu látky, obsahující železo, ve které je hydroxid železitý vázán na komplexotvornou složku, sestávající ze sorbitu, glukonové kyseliny a oligosacharidu ve stanovených poměrech, kde převládá sorbit. V jednom z příkladů provedení vynálezu je jako oligosacharid použit hydrogenovaný dextran se střední molekulovou hmotností

přibližně 1 000 Daltonů (1 kg.mol^{-1}). Z postupu, popsaného pro výrobu tohoto dextranu, lze odvodit, že musí mít vysoký podíl složek o velmi nízké molekulové hmotnosti. Ve spojitosti s předloženým vynálezem je velmi důležité vysvětlení, že v okamžiku tvorby komplexu je přítomno velké množství hydrogenovaného monomeru dextranu, tj. sorbitu.

Jak vyplývá ze svrchu uvedených patentů, mají přípravky vyrobené podle současného stavu techniky - vzdor řadě pokusů zlepšit přípravky železa s dextranem pro léčbu anemie - stále ještě některé nedostatky.

Je to způsobeno tím, že u některých pacientů mohou přípravky vyvolat pozdní přecitlivělost, nebo těžké anafylaktické vedlejší účinky, projevující se např. jako dyspnea (dušnost), nízký krevní tlak, šok a smrt. Je možno pozorovat i jiné toxické reakce.

Vedle toho nevyhovují některé přípravky, vyrobené podle dosavadního stavu techniky, současným požadavkům na stálost. Nedostatek stálosti se může projevit jako rosolovatění kapaliny nebo tvorba sraženiny hydroxidu nebo oxyhydroxidu železitého.

Podstata vynálezu

Na základě výzkumu, pokusů a praktických zkušeností bylo zjištěno, že svrchu uvedené nedostatky jsou spojeny s přítomností nedostatečně hydrolyzovaného dextranu o relativně vysoké molekulové hmotnosti, přítomného - i když v nepatrných množstvích - v dextranu, použitém jako výchozí látka, jakož i

s přítomností v něm obsažených cukrů s nízkou molekulovou hmotností.

Všeobecně se uznává, že dextrany s vysokou molekulovou hmotností představují s ohledem na anafylaktické reakce větší riziko, než dextrany s nízkou molekulovou hmotností. Je skutečně běžnou praxí snižovat při infuzi klinického dextransu riziko anafylaktických reakcí tím, že se pacientovi předem injikuje dextran o nízké molekulové hmotnosti, jako je dextran s průměrnou molekulovou hmotností M_w přibližně 1 000 Daltonů ($1 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Výroba dextransu obvykle zahrnuje kyselou hydrolýzu dextransů s vyšší molekulovou hmotností, následovanou izolačními a čisticími postupy včetně srážení dextransu např. z vodného roztoku přidáním např. alkoholu.

Při tomto srážení se srazí nejen požadovaný podíl dextransu, ale srazí se také veškerý dextran o vyšší molekulové hmotnosti, takže získaný dextranový podíl často obsahuje dextrany o vysoké molekulové hmotnosti, které nebyly rozštěpeny předcházející kyselou hydrolýzou.

Vzhledem k tomu, že i velmi nízké koncentrace dextransů o vysoké molekulové hmotnosti jsou schopny vyvolat nepředvídatelné a často velmi závažné anafylaktické reakce, je význačným rysem předloženého vynálezu, že přítomnost takovýchto dextransů musí být vyloučena náhradou nebo doplněním běžných srážecích postupů membránovými postupy, schopnými vyloučit velmi účinně dextrany o vysoké molekulové hmotnosti, a to před tím, než se požadovaná dextranová frakce dostane do styku se sloučeninami železa.

Bylo však zjištěno, že odstranění dextranů o vysoké molekulové hmotnosti z požadovaného podílu s molekulovou hmotností např. 10 000 Daltonů (10 kg.mol^{-1}) nezajišťuje, aby výsledná látka s železem a dextranem byla netoxická a stálá. Bylo také zjištěno, že obtíže způsobuje i přítomnost cukrů o nízké molekulové hmotnosti, jako jsou monosacharidy, pocházející z hydrolytického postupu.

Přítomnosti takovýchto cukrů byl dosud připisován jen malý význam. Když však dextran, obsahující tyto cukry, reaguje se železem, pak hydroxid železitý, který se sráží v jejich přítomnosti, vytváří nejen asociační komplexy dextran - železo, ale se železem se spojují i cukry a vytvářejí komplexní nebo asociační sloučeniny.

Tyto sloučeniny železa s cukry jsou však daleko méně stálé než sloučeniny železa s dextranem a ve vodném roztoku z nich vzniká určitá koncentrace železitých iontů a cukrů o nízké molekulové hmotnosti, jako je glukosa.

Jak je dobře známo, mají železité ionty, přítomné v přípravcích pro parenterální podávání, toxické účinky. Kromě toho se ukázalo, že nestálost vodného roztoku dextranu se železem nezpůsobují jen železité ionty, ale i cukry s nízkou molekulovou hmotností, a to pro srážecí a /nebo želatinující pochody, které mohou v průběhu dní nebo měsíců způsobit úplné ztuhnutí roztoku. Zdá se dále, že přítomnost cukrů o nízké molekulové hmotnosti zvyšuje parenterální toxicitu roztoku železa s dextranem, zřejmě proto, že cukry jsou na překážku vazbě sloučenin železa na dextran a tím vytvářejí volné nebo slabě vázané ionty železa.

Ačkoliv vazba mezi cukry s nízkou molekulovou hmotností a sloučeninami železa je - jak vyplývá ze shora uvedených skutečností - poměrně slabá, postačuje k tomu, aby bránila účinnému odstranění cukrů a volných sloučenin železa dialysou, které se roztok železa s dextranem běžně podrobuje jako závěrečnému kroku.

Dalším důležitým rysem předloženého vynálezu je proto nutnost čistit dextranovou frakci membránovými postupy, které odstraňují cukry o nízké molekulové hmotnosti, a to dříve, než se použije v reakci, při které se vytváří komplex, obsahující železo nebo asociační sloučeniny.

Předložený vynález se tedy zabývá sloučeninami železa s dextranem, které mají mimořádně nízký výskyt nežádoucích postranních účinků a jsou dostatečně stálé i v průběhu sterilizace a uchovávání v podobě vodných roztoků. Tuto sloučeninu železa s dextranem lze použít jako složku léčebných prostředků pro profylaxi nebo léčení nedostatku železa parenterálním podáním u zvířat i lidí; sloučenina železa s dextranem se při tom vyznačuje tím, že obsahuje hydrogenovaný dextran s hmotnostní střední molekulovou hmotností (M_w) mezi 700 a 1 400 Daltony ($0,7-1,4 \text{ kg.mol}^{-1}$), s výhodou přibližně 1 000 Daltonů (1 kg.mol^{-1}) a s číselnou střední molekulovou hmotností (M_n) od 400 do 1 400 Daltonů ($0,4-1,4 \text{ kg.mol}^{-1}$), ve kterém má 90 hmotnostních % dextranu molekulovou hmotnost menší než 2 700 Daltonů ($2,7 \text{ kg.mol}^{-1}$) a hmotnostní střední molekulová hmotnost 10 hmotnostních % dextranového podílu s nejvyššími molekulovými hmotnostmi je menší než 3 200 Daltonů ($3,2 \text{ kg.mol}^{-1}$). Uvedený dextran byl přitom ve stabilní asociaci s oxyhydroxidem železitým

podroben čištění membránovými postupy, které mají vylučovací hranici mezi 340 a 800 Daltony ($0,3$ a $0,8 \text{ kg.mol}^{-1}$).

V předloženém vynálezu znamenají výrazy "hmotnostní střední molekulová hmotnost" a "číselná střední molekulová hmotnost" příslušné střední molekulové hmotnosti v okamžiku, kdy dochází ke tvorbě komplexu, a to na základě všech dextranových molekul od monomeru výše.

Předpokládá se, že příčina, proč dextrany o svrchu uvedeném rozdělení molekulových hmotností nenalezly obchodní využití ve výrobě sloučenin železa s dextranem, je skutečnost, že nebyla věnována dostatečná pozornost přítomnosti cukrů s nízkou molekulovou hmotností, které způsobovaly toxicitu a malou stálost a že nebyla věnována pozornost tomu, že dextrany o hmotnostní střední molekulové hmotnosti kolem $1\,000$ Daltonů (1 kg.mol^{-1}) jsou lidským i zvířecím organismem lépe snášeny než dextrany o vyšší molekulové hmotnosti, běžně používané u přípravků s železem.

Při použití pro parenterální podání se příslušná sloučenina rozpustí nebo rozptýlí ve vodné kapalině a může se uvést na trh jako taková, nejlépe s obsahem železa od 5 do 20% (hmotnostních vztažených na objem). Sloučenina je však dostatečně stálá, aby mohla být vysušena v běžném sušicím postupu, jako je sušení rozprašováním; sloučenina může být proto uvedena na trh i jakožto taková nebo jako dílčí složka suchého prášku. Obsah železa je při tom obvykle 15 až 45% (hmotn./hmotnost).

Vliv koncových skupin (částečně hydrogenovaných aldehydových skupin) polymerního řetězce je u dextranů s

poměrně nízkou molekulovou hmotností, jako jsou ty, které přicházejí v úvahu podle předloženého vynálezu, podstatně výraznější, než u dextranů s vyšší molekulovou hmotností, a to proto, že počet funkčních koncových skupin je na hmotnostním základě vyšší. Tyto funkční koncové skupiny přispívají k růstu nestálosti v důsledku reakcí trojmocných iontů železa a cukrů s nízkou molekulovou hmotností. Nepřítomnost iontů trojmocného železa je proto ještě důležitější než v případě přítomnosti dextranů s vyšší molekulovou hmotností.

Předložený vynález také zahrnuje způsob výroby výše popsané sloučeniny železa s dextranem; postup se zakládá na následujících krocích :

Molekulová hmotnost dextranu se zmenší hydrolýzou a dextran se hydrogenuje tak, aby se funkční aldehydové koncové skupiny převedly na skupiny alkoholové; hydrogenovaný dextran ve formě vodného roztoku se spojí s nejméně jednou rozpustnou železitou solí. K výslednému roztoku se přidá zásada, aby se vytvořil hydroxid železitý a výsledná směs se zahřeje k přeměně hydroxydu železitého na oxyhydroxid železitý jako asociační sloučeninu s dextranem. Tento způsob se vyznačuje tím, že po hydrolýze, ale před spojením s vodorozpustnou železitou solí, se dextran čistí jedním nebo několika membránovými postupy za použití membrány s takovou vylučovací hranicí, která zadrží dextran s molekulovou hmotností vyšší než 2 700 Daltonů ($2,7 \text{ kg.mol}^{-1}$), následovanými případně další hydrolýzou a jedním nebo několika membránovými postupy s vylučovací hranicí mezi 340 a 800 Daltony ($0,34$ a $0,8 \text{ kg.mol}^{-1}$).

Nejvýhodnější ztělesnění způsobu výroby zahrnuje následující úkony :

přípravu vodného roztoku, zahrnujícího vyčištěný hydrogenovaný dextran a nejméně jednu vodorozpustnou železitou sůl;

úpravu pH uvedeného vodného roztoku přidáním zásady na hodnotu vyšší než 10;

zahřátí směsi na teplotu nad 100°C, až se změní na černý nebo tmavohnědý koloidní roztok, který lze zfiltrovat přes filtr 0,45 µm; a

další čištění a stabilizaci za použití filtrace, zahřívání a membránových postupů a přidání jednoho nebo několika stabilizátorů a dále případné vysušení roztoku k získání požadované sloučeniny železa s dextranem v podobě stálého prášku. Injekční roztoky se mohou připravovat zpětným rozpuštěním tohoto prášku, úpravou pH, sterilizací pomocí filtrace a plněním do ampulí nebo lahviček. Sterilizace se může rovněž provádět autoklávováním naplněných ampulí nebo lahviček.

Jinou možností je vynechání sušicího postupu a příprava injekčního roztoku z vyčištěného roztoku bez jeho předchozího vysušení.

V dalším výhodném ztělesnění se hydrogenace dextranu provádí ve vodném roztoku borohydridem sodným.

Stabilizace se s výhodou provádí přidáním soli organické hydroxykyseliny, nejlépe citrátu.

Předložený vynález rovněž zahrnuje použití sloučeniny, sestávající z hydrogenovaného dextranu, nebo jej obsahující, o hmotnostní střední molekulové hmotnosti 700 - 1 400 Daltonů ($0,7-1,4 \text{ kg.mol}^{-1}$), s výhodou přibližně 1 000 Daltonů (1 kg.mol^{-1}) a s číselnou molekulovou hmotností od 400 do 1 400 Daltonů ($0,4-1,4 \text{ kg.mol}^{-1}$), ve kterém má 90 hmotnostních % dextranu molekulové hmotnosti menší než 2 700 Daltonů ($2,7 \text{ kg.mol}^{-1}$) a hmotnostní střední molekulová hmotnost 10 hmotnostních % dextranového podílu s nejvyššími molekulovými hmotnostmi je menší než 3 200 Daltonů, a to ve stálé asociaci s oxyhydroxidem železitým, přičemž byl tento hydrogenovaný dextran předběžně podroben vyčištění membránovými postupy s vylučovací hranicí mezi 340 a 800 Daltony ($0,3 \text{ a } 0,8 \text{ kg.mol}^{-1}$); a to pro přípravu léčebného přípravku pro parenterální podání, určeného k léčení nebo profylaxi anemie s nedostatkem železa u zvířat nebo lidí.

Předložený vynález je dále ozřejmen následujícími příklady, na něž se neomezuje.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

1. Hydrolýza a hydrogenace dextranu

2,522 kg hydrolyzovaného dextranu, který byl zachycen jako podíl, prošlý membránou s vylučovací hranicí menší než

5000 Daltonů ($5 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$), byl hydrolyzován při pH 1,5 a při teplotě 95°C .

Hydrolýza byla sledována chromatograficky za použití gelové permeační chromatografie (GPC) a byla zakončena ochlazením, když molekulové hmotnost hydrolyzované látky dosáhla požadované hodnoty, tj. hmotnostní střední molekulové hmotnosti 700 - 1 400 Daltonů ($0,7-1,4 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Hydrolýzou vzniká dextran o nízké molekulové hmotnosti, ale také glukosa. Po ochlazení a neutralisaci bylo množství glukosy a oligomerů o velmi nízké molekulové hmotnosti sníženo membránovými postupy, které měly vylučovací hranici 340-800 Daltonů ($0,34-0,8 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$). Po tomto postupu byl obsah dextranu stanoven optickou rotací (α_D^{20} přibližně 200) na 1,976 kg a obsah redukujícího cukru byl stanoven pomocí Somogyiho činidla na 36,8 %.

Redukční schopnost byla snížena působením borohydridu sodného. Na 1,976 kg dextranu bylo přidáno 57 kg borohydridu sodného při zásaditém pH.

Po působení borohydridu sodného byla zjištěna redukční schopnost 1,5%.

Poté byl roztok neutralizován na pH menší než 7,0 a následně deionizován. Střední molekulové hmotnosti a distribuce molekulových hmotností byly stanoveny chromatograficky.

Chromatografie také potvrdila, že byly splněny výše uvedené podmínky, tj. že 90 hmotnostních % dextranu má

molekulové hmotnosti nižší než 2 700 Daltonů ($2,7 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) a že hmotnostní střední molekulová hmotnost 10 hmotnostních % dextranového podílu s nejvyššími molekulovými hmotnostmi je nižší než 3 200 Daltonů ($3,2 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Bylo zjištěno, že hmotnostní střední molekulová hmotnost je 1 217 Daltonů a číselná střední molekulová hmotnost 845 Daltonů ($0,845 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$). Výsledné množství dextranu po deionizaci, stanovené optickou rotací, bylo 1,320 kg.

2. Syntéza železa s dextranem

120 kg dextranu, získaného výše uvedeným postupem, bylo jako 18% roztok smíšeno se 150 kg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Ke směsi bylo za míchání přidáno 93 kg Na_2CO_3 v nasyceném vodném roztoku a poté bylo pH zvýšeno na hodnotu 10,5 přidáním 24 litrů koncentrovaného vodného NaOH (27% hmotn./objem).

Takto získaná směs byla zahřívána na více než 100°C , dokud se nepřeměnila na černý, temně hnědý koloidní roztok, který bylo možno zfiltrovat přes filtr $0,45 \mu\text{m}$ a následně byla ochlazená. Po ochlazení byl roztok neutralizován za použití 12 l koncentrované kyseliny chlorovodíkové na pH 5,8 a čištěn membránovými postupy, pokud obsah chloridu v roztoku nedosáhl hodnoty nižší než 0,68 %, vypočtené pro roztok, obsahující 5 % (hmotn./objem) železa.

Pokud byl obsah chloridu v roztoku menší než ten, který byl požadován k získání izotonického roztoku, byl přidán chlorid sodný a pH bylo následně upraveno na 5,6; roztok byl

potom zfiltrován přes membránový filtr 0,45 μm (nebo případně přes filtr 0,2 μm).

Roztok byl vysušen rozprašováním a prášek železa s dextranskem byl připraven k uvedení na trh nebo pro další zpracování.

Jinou možností vedle sušení rozprašováním bylo použití roztoku pro bezprostřední výrobu injekčních roztoků s obsahem železa např. 5%, jak je uvedeno výše.

Pokud byl prášek železa s dextranskem použit pro přípravu injekčních nebo infuzních roztoků, byl zpětně rozpuštěn ve vodném prostředí, bylo zjištěno pH, a pokud bylo třeba, bylo i upraveno a roztok byl po sterilizaci a filtraci plněn do ampulí nebo lahviček. Alternativně byla sterilizace prováděna autoklávováním po naplnění do ampulí nebo lahviček.

Příklad 2

1. Hydrolýza a hydrogenace dextransku

Tato část syntézy byla provedena tak, jak je popsáno ve výše uvedeném bodu 1 příkladu 1, s tím rozdílem, že bylo použito 54 kg borohydridu sodného a redukční schopnost se tím snížila na 3%.

2. Syntéza železa s dextranskem

120 kg výše uvedeného dextransku bylo jako 18% roztok smíseno s 300 kg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

K roztoku bylo za míchání přidáno 180 kg Na_2CO_3 , jako nasycený vodný roztok a poté bylo pH směsi zvýšeno na hodnotu 11,5 za použití 38 litrů koncentrovaného vodného NaOH (27% hmotn./objem).

Získaná směs byla zahřívána na teplotu vyšší než 100°C , dokud se nezměnila na černý, temně hnědý koloidní roztok a mohla být zfiltrována přes filtr $0,45\ \mu\text{m}$ a následně zchlazena. Ochlazený roztok byl neutralizován na pH 5,6 za použití 25 litrů koncentrované kyseliny chlorovodíkové a čištěn membránovými postupy, až se obsah chloridu snížil na méně než 1,1 % (počítáno na základě roztoku, obsahujícího 10 % železa (hmotn./objem)).

Pak byla přidána hydroxykyselina v podobě 6 kg kyseliny citronové, pH bylo upraveno na hodnotu větší než 8,0 za použití NaOH a roztok byl stabilizován zvýšením teploty nad 100°C po dobu 60 minut.

Následně bylo pH upraveno na 5,6 pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové. V případě, že obsah chloridu v roztoku byl nižší než očekávaný, byl upraven přidáním NaCl.

Roztok byl nato zfiltrován přes membránový filtr $0,45\ \mu\text{m}$ (nebo $0,2\ \mu\text{m}$).

Roztok byl vysušen rozprašováním a příprava prášku železa s dextranem tak byla dokončena.

Tento prášek se hodí pro výrobu kapalného přípravku železa s dextranem, obsahujícího přibližně 10 % železa (hmotn./objem).

Příklad 3

1. Hydrolýza a hydrogenace dextranu

Tato část syntézy byla provedena stejně jako ve výše uvedeném příkladu 2.

2. Syntéza železa s dextranem

80 kg výše uvedeného dextranu bylo v podobě 10% vodného roztoku smíseno s 400 kg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

K roztoku bylo za míchání přidáno 232 kg Na_2CO_3 v nasyceném vodném roztoku a poté byla hodnota pH zvýšena na 11,5 za použití 60 litrů koncentrovaného vodného NaOH (27%, hmotn./objem).

Výše uvedená směs byla zahřívána na více než 100°C , dokud se nezměnila na černý, tmavě hnědý koloidní roztok, který bylo možno zfiltrovat přes filtr $0,45\ \mu\text{m}$, načež byl ochlazen. Chladný roztok byl neutralizován 15 litry koncentrované kyseliny chlorovodíkové na pH 5,6 a čištěn membránovými postupy, až vykazoval obsah chloridu menší než 1,8 %, počítáno na základě roztoku, obsahujícího 20 % železa (hmotn./objem).

Potom byla přidána hydroxykyselina v podobě 8 kg kyseliny citronové a pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu vyšší než 8,0; roztok byl pak stabilizován zahřátím na teplotu nad 100°C po dobu 60 minut.

Nato byla hodnota pH upravena koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na 5,6. V případě, že obsah chloridu byl menší než očekávaný, byl upraven přidáním NaCl. Roztok byl pak zfiltrován přes membránový filtr 0,45 μm (nebo 0,2 μm).

Roztok byl vysušen rozprašováním a tím byl dokončen prášek železa s dextranem. Tento prášek je vhodný pro přípravu kapalného přípravku s 20% (hmotn./objem) obsahem železa.

Ve všech třech příkladech je výtěžek prášku železa s dextranem vyšší než 95%, počítáno vzhledem k železu, použitému v postupu.

Zastupuje :

P A T E N T O V Ě N Á R O K Y

1. Sloučenina železa s dextranem pro použití jako složka v léčebném prostředku pro profylaxi nebo léčení nedostatku železa u zvířat nebo lidí parenterálním podáním, obsahující ve stálé asociaci s oxyhydroxidem železitým hydrogenovaný dextran, v y z n a č u j í c í s e t í m , že má hmotnostní střední molekulovou hmotnost mezi 700 a 1 400 Daltony ($0,7$ a $1,4 \text{ kg.mol}^{-1}$), s výhodou 1 000 Daltonů (1 kg.mol^{-1}) a číselnou střední molekulovou hmotnost od 400 do 1400 Daltonů ($0,4$ - $1,4 \text{ kg.mol}^{-1}$), kde 90 hmotnostních % dextranu má molekulové hmotnosti menší než 2 700 Daltonů ($2,7 \text{ kg.mol}^{-1}$) a hmotnostní střední molekulová hmotnost 10 hmotnostních % podílu dextranu s nejvyššími molekulovými hmotnostmi činí méně než 3 200 Daltonů ($3,2 \text{ kg.mol}^{-1}$), přičemž uvedený hydrogenovaný dextran byl podroben čištění membránovými postupy s vylučovací hranicí mezi 340 a 800 Daltony ($0,3$ a $0,8 \text{ kg.mol}^{-1}$).

2. Sloučenina železa a dextranu podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že je jedinou nebo dílčí složkou suchého prášku.

3. Sloučenina železa a dextranu podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že je prášek, jehož je sloučenina jedinou nebo dílčí složkou, má obsah železa 15 - 45 % hmotnostních vůči hmotnosti.

4. Sloučenina železa a dextranu podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se rozpouští nebo rozptýluje ve vodné kapalině.

5. Sloučenina železa a dextranu podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se rozpouští nebo rozptyluje ve vodné kapalině v takovém množství, že obsah železa ve výsledném roztoku nebo disperzi činí 5 - 20 % hmotnostních vůči objemu.

6. Způsob výroby sloučeniny železa s dextranem podle nároku 1, při kterém se molekulová hmotnost dextranu zmenší hydrolýzou a dextran se hydrogenuje k přeměně funkčních aldehydových koncových skupin na skupiny alkoholové; hydrogenovaný dextran ve formě vodného roztoku se spojí s nejméně jednou rozpustnou železitou solí a k výslednému roztoku se přidá zásada, aby se vytvořil hydroxid železitý a výsledná směs se zahřeje k přeměně hydroxydu železitého na oxyhydroxid železitý jako asociační sloučeninu s dextranem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že po hydrolýze, ale před spojením s vodorozpustnou železitou solí, se dextran čistí jedním nebo několika membránovými postupy za použití membrány s takovou vylučovací hranicí, která zadrží dextran s molekulovou hmotností vyšší než 2 700 Daltonů ($2,7 \text{ kg.mol}^{-1}$) a případně následuje další hydrolýza a jeden nebo několik membránových postupů s vylučovací hranicí mezi 340 a 800 Daltony ($0,34 \text{ a } 0,8 \text{ kg.mol}^{-1}$).

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í, že zahrnuje následující kroky :

přípravu vodného roztoku, obsahujícího výsledný hydrogenovaný dextran a alespoň jednu vodorozpustnou železitou sůl;

úpravu pH uvedeného roztoku na hodnotu vyšší než 10 přidáním zásady;

zahřívání směsi na teplotu vyšší než 100°C, dokud se nezmění na černý, temně hnědě koloidní roztok, který lze zfiltrovat přes filtr 0,45 μm ; a

čištění a stabilizaci roztoku za použití filtrace, zahřátí a membránových postupů a přidání jednoho nebo více stabilizátorů a případně vysušení roztoku k získání požadované sloučeniny železa s dextranem v podobě stálého prášku.

8. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že hydrogenace dextranu se provádí borohydridem sodným ve vodném roztoku.

9. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stabilizace zahrnuje přidání alespoň jedné soli organické hydroxykyseliny, s výhodou vybrané mezi citronany.

10. Použití sloučeniny, obsahující, ve stálé asociaci s oxyhydroxidem železitým, hydrogenovaný dextran s hmotnostní střední molekulovou hmotností mezi 700 a 1 400 Daltony (0,7 a 1,4 kg.mol^{-1}), s výhodou 1 000 Daltonů (1 kg.mol^{-1}) a číselnou střední molekulovou hmotností od 400 do 1400 Daltonů (0,4-1,4 kg.mol^{-1}), kde 90 hmotnostních % dextranu má molekulové hmotnosti menší než 2 700 Daltonů (2,7 kg.mol^{-1}) a hmotnostní střední molekulová hmotnost 10 hmotnostních % podílu dextranu s nejvyššími molekulovými hmotnostmi činí méně než 3 200 Daltonů (3,2 kg.mol^{-1}), přičemž byl tento hydrogenovaný dextran podroben čištění membránovými postupy s vylučovací hranicí mezi 349 a 800 Daltony (0,349 a 0,8 kg.mol^{-1}), pro přípravu léčebného prostředku, který lze podat parenterálně,

pro profylaxi a léčení anemie s nedostatkem železa u zvířat nebo lidí.

11. Způsob výroby injekčního roztoku, obsahujícího sloučeninu podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina se rozpustí jako prášek ve vodném prostředí, pokud je třeba, upraví se pH, podle volby se přidá stabilizátor a roztok se sterilizuje filtrací před naplněním do ampulí nebo lahviček, nebo autoklávováním po naplnění do takových ampulí nebo lahviček.

12. Způsob výroby injekčního roztoku, obsahujícího sloučeninu podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že roztok, připravený podle nároku 6, se vyčistí, upraví pokud jde o obsah železa a hodnotu pH, stabilizuje a sterilizuje filtrací před naplněním do ampulí nebo lahviček, nebo autoklávováním po naplnění do ampulí nebo lahviček.

Zastupuje :