

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
C08B 37/08

(45) 공고일자 1991년09월02일
(11) 공고번호 특1991-0006811

(21) 출원번호	특1987-0002636	(65) 공개번호	특1987-0008916
(22) 출원일자	1987년03월23일	(43) 공개일자	1987년10월22일
(30) 우선권 주장	19864A/86 1986년03월25일 이탈리아(IT)		
(71) 출원인	메디올라눔 파르마슈티시 에스알엘 리날도 델 보노		
	이탈리아공화국 밀라노 비아 에스. 기우세페 코톨렌고 31		

(72) 발명자	리날도 델 보노 이탈리아공화국 밀라노 비아 에프. 카사티 32 루이지 데 앙브로시 이탈리아공화국 산티아(투) 비아 카르두치 8 지안니 페라리 이탈리아공화국 밀라노 비아 파사렐라 4 피에르 루이지 루 갈리 이탈리아공화국 밀라노 비아 초핀 89 피에르 기우세페 파젤라 이탈리아공화국(알렉산드리아) 15015 이솔라 에스. 안토니오 프라프. 카 프라글리아 (74) 대리인 이병호
----------	---

심사관 : 감석주 (책자공보 제2451호)

(54) 고-순도 더마탄 설페이트의 제조방법

요약

내용 없음.

명세서

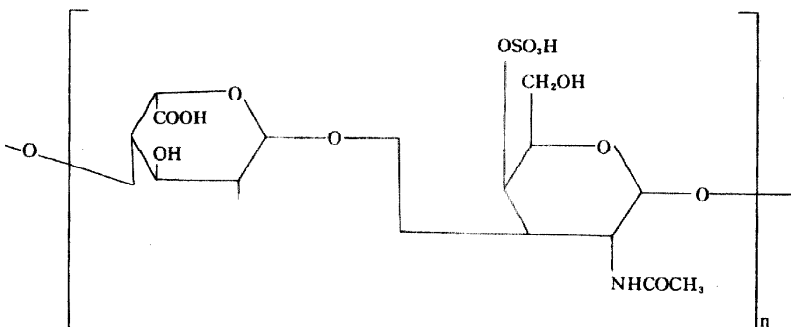
[발명의 명칭]

고-순도 더마탄 설페이트의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 고-순도 더마탄 설페이트의 신규 제조방법 및 유효성분으로서 이를 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

더마탄 설페이트(DS)는 1,3글루코사이드 결합에 의해 연결된, 1몰의 이두론산 및 1몰의 N-아세틸 갈락토사민 설포네이트를 함유하는 하기 구조식의 이당류의 반복단위로 구성된 무코다당류(MPS)로 공지되어 있다.



DS의 분자량은 프로테오글리칸을 추출하는데 사용된 방법, 및 이를 MPS에서 분리하는데 사용된 방법에 따라 변할수 있다.

설포산 그룹에 대한 카복실의 비는 이론적으로는 1 : 1인데, 실제로는 일부의 갈락토사민 및 이두론

산 단위내의 다수의 설펜화하이드록실의 존재로 인해 또한 변화할 수 있다.

DS는, 헤파린 조인자 II를 선택적으로 활성화시켜 혈액응고과정을 조절하는 기타 다수의 세린 프로테아제 억제제를 방해하지 않고 상당한 항트롬빈 작용을 나타낼 수 있다는 것이 밝혀져 최근에 이에 대한 관심이 고조되고 있다.

그러나, 약제로서의 이의 사용 가능성은, 존재하는 각종 그룹의 화학적 변이나 분해를 일으키지 않고 실제로 변질되지 않은 상태로 천연의 프로테오글리칸으로부터 이의 추출 가능성, 및 음성 부작용을 일으킬 수 있는 외부물질(예 : 단백질 및 뉴클레오타이드)을 실제로 완전히 제거하는데 대한 가능성에 따라 결정된다.

실제적인 면에서, 상술한 필요조건을 만족시키는 DS 제조방법을 확립하는 것은 매우 어렵다는 것이 판명되었다.

따라서, 농도를 변화시키면서 무기염 용액으로 위의 피부 프로테오글리칸을 추출하는 것에 대한 연구(참조 : Chemical Abstracts-vol. 84, 1976-page 194-abstract 71173d) 결과, 다른 프로테오글리칸과 더마탄설펜이트 소량과의 혼합물이 수득되었다. 글리코사미노글리칸의 혼합물에서 순수한 더마탄 설펜이트를 분리 시키는 것은 수행하기 어렵고 매우 낮은 수율의 최종 생성물을 수득하게 된다.

또한, 유럽 특허원 제0097625호에 기재된 바와같이, 상이한 온도에서 분별결정하여 글리코사미노글리칸 수용액으로부터 수득한 더마탄 설펜이트는 목적하는 순도를 충족시키지 못한다.

이제, 본 발명자는 본 발명의 주된 문제, 즉 출발물질내에 존재하면서 분지량 및 구조면에서 실제로 변화되지 않고 바람직하지 않은 부작용을 유발할 수 있는 불순잔여물을 전혀 함유하지 않은 DS를 동물의 기관에서 추출시키는 방법을 밝혀내었다.

신규한 방법은 다음 단계를 필수적으로 포함한다 : a) 원료물질을 바람직하게는 소 또는 돼지의 소장점막, 또는 소의 허파, 체장, 대동맥, 비장, 뇌, 흉선 또는 연골의 형태로 선택하고, 변질을 방지하기 위해 이를 급속히 동결시키고 : b) 그러한 또는 냉아세톤으로 균질화한 원료물질을 CaCl_2 수용액으로 초미분화 시키고 : c) 수성 원료물질/ CaCl_2 균질물을 단백질 분해효소로 알칼리성 pH 및 저온에서 효소적으로 분해 시키고 : d) 분해물을 산성화하고, 가열한 다음 여과시키고 : e) 투명여액을 MPS를 착화시킬 수 있는 4급 암모늄염으로 처리하고, f) DS를 고순도로 선택적으로 여과시킨다.

대략적으로 제시한 개별적인 제조단계의 수행방법을 다음과 같이 더 상세히 기술한다.

원료물질의 제조를 포함하는 단계 a)는 다음 단계에 적합한 물질을 제공하기에 적당한 각종의 방법으로 수행할 수 있다.

CaCl_2 와의 혼합을 포함하는 단계 b)는 신규 방법에서 필수적으로 중요한 단계중의 하나로, 본 발명의 본질을 변경하지 않는 각종의 방법으로 사실상 수행할 수 있다.

그와 같이 동결시킨 원료 균질물의 경우, 이를 원료물질 : 용액의 중량비가 1 : 0.5가 되도록 하는 양의 0.01M CaCl_2 수용액을 사용하여 초미분화시킨다.

물질을 아세톤-처리된 분말의 형태로 사용할 경우, 초기 동결물질을, 물질 : 용액의 중량비가 1 : 1이 되도록 하는 양의 1M CaCl_2 수용액을 사용하여 초미분화시키고, 매스(mass)를 냉(+5°) 아세톤과 함께 1 : 3의 중량비로 교반시킨 다음 여과하고, 잔사를 1 : 2의 중량비로 냉아세톤에 다시 녹여 여과하고, 잔사를 다시 한번 1 : 1의 중량비로 냉아세톤에 녹인다. 최종 잔사를 35°C에서 진공하에 건조시키고, 후속 효소분해를 위해 저온에서 보존하거나, 1 : 20의 비로 탈이온수와 적합한 반응기내에서 혼합시킴으로써 분해단계로 직접 도입시킬 수 있다.

다른 방법으로, 동결된 출발물질을, 물질 : 용액의 중량비가 1 : 10이 되도록 하는 양의 0.1M CaCl_2 용액을 사용하여 초미분화시킨다. 혼합물을 소-구경 회전자(smoll-bore rotor)로 분무-건조시키고 150°C가 넘지 않는 온도에서 공기를 도입시키는데, 접촉시간은 수초가 넘지 않게 한다. 이런 방법으로 형성된 분말을, 후속의 분해를 위해 저온에서 플라스틱 주머니(bag)에 보존하거나, 분말 : 물의 중량비가 1 : 20이 되도록 하는 양의 탈이온수를 사용하여 반응기내로 이를 도입시킴으로써 바로 사용할 수도 있다.

DS가 특히 흉선, 뇌하수체 또는 심장과 같은 섬세한 기관에서 추출되는 경우, 소-규모공정용으로는 동결건조하는 것이 유리할 수 있다. 이 경우 동결된 물질을 원료 물질 : CaCl_2 용액의 중량비가 1 : 1인, 10%의 분말화 솔비톨을 함유하는 1M CaCl_2 수용액을 사용하여 초미분화시킨다.

2cm 두께로 층침(stratification)시킨 후, -40°C에서 동결시키고 잔류수분에 대한 확산펌프를 최종적으로 사용하여 25°C에서 동결 건조시킨다. 동결 건조 생성물은 약 2%의 수분함량을 갖는 부서지기 쉬운 분말의 형태이다. 동결 건조된 분말을 다음 분해를 위해 보존하거나, 다음단계를 수행하기 위해 1 : 20의 비율의 탈이온수로 바로 희석시킬 수 있다.

효소분해 단계를 포함하는 단계 c)는 DS의 해중함이나 분해가 일어나지 않도록 특히 완화된 조건하에 정상 단백질분해효소(예 : 트립신, 키모트립신, 및 바람직하게는 알칼라아제, 목사타아제 및 수퍼라아제)를 사용하여 수행시킴을 특징으로 한다.

수성 혼합물을 바람직하게는 CaOH_2 를 사용하여 pH7내지 9로 알칼리성화시킨 다음 40° 내지 55°C의 온도로 가열한다. 이어서 효소를 원료물질 : 효소의 중량비가 1 : 0.0001 내지 1 : 0.001이 되도록 하는 양으로 원료물질에 가한다. 분해는 프로테오글리칸 분해가 완결되는 때를 측정하기 위해 전기 이동점검을 계속하면서 6내지 24시간동안 계속시킨다. 이 시점에서, 매스는 완전히 유체이다.

상기 유동성 분해물로 다음 단계 d)를 수행하는데, 이는 소량의 다른 산을 사용할 수 있지만, 이미 존재하는 염소이온외의 다른 이온의 도입을 막기 위해, 바람직하게는 HCl을 사용하여 3내지 6의 pH로 약산성화시키고, 유동성매스를 약1시간 동안 70내지 80℃로 가열함을 특징으로 한다.

단계 d)의 조건은 단백질 응고 및 존재하는 Ca염과의 착화합물의 형태로 핵단백질 유도체의 침전을 유발한다. 동시에, pH 및 온도조건은 MPS가 Ca염의 형태로 용해할수 있게 한다. 용액을 회전식 여과기로 여과시키고, 가능하면 압축여과기로 여과시켜 미량의 염화(salified) 지방산도 제거한다.

이러한 방법으로 Ca염의 형태로 MPS만을 함유하는 실제로 순수하고 완전히 투명한 여액을 수득한다.

이 투명용액은 다음 단계 e)에서 직접 사용할수 있거나, 바람직하게는, 먼저 전기영동으로 분석하여 존재하는 MPS의 질 및 양을 측정한다.

초기에 진술한 바와같이, 단계 e)는 필수적으로 MPS Ca염을 함유하는 수용액 MPS와 함께 불용성 착화합물을 형성할 수 있는 암모늄염으로 처리하는 것으로 구성된다. 그러나 본 발명의 목적은 약제학적 순도의 DS를 수득하는 것으로서, 다음과 같은 2가지 다른 방법을 사용할 수 있다 : 1)용액을 착화합물을 형성하고 DS를 선택적으로 침전시키는 디메틸-에틸-세틸 암모늄 에틸 설페이트로 처리하거나, 또는 2)용액을 바람직하게는 히아민, 세틸-트리메틸암모늄 브로마이드 및 세틸-디메틸 에틸암모늄 브로마이드중에서 선택된 4급 암모늄염으로 처리하는데, 이 암모늄염은 MPS모두를 착화합물 형태로 침전시킬 수 있고, 이로부터 DS착화합물은 유기용매를 사용한 선택적 가용화에 의해 분리된다.

방법의 선택은 주로 용액내의 DS 및 MPS의 상대적인 양, 및 DS외에 MPS의 회수여부에 좌우된다.

일반적으로, 방법 1)에 따른 DS의 선택적 침전이 바람직하다.

디메틸-에틸-세틸 암모늄 에틸설페이트로 침전시키기 위해서는, 이 염을, 원료물질을 동결된 균질물의 형태로 사용할 경우는 출발원료에 대한 중량비가 약 1 : 1500이 되도록 하는 양으로, 또한 원료물질을 분말의 형태로 사용할 경우에는 원료물질에 대한 중량비가 1 : 300이 되도록 하는 양으로 용액에 가한다. 혼합물을 수시간 동안 방치한다. DS 착화합물은 Ca 이온이 존재하기 때문에 급속히 침전한다. 이를 가만히 따르고 원심분리기로 착화합물을 수집한다.

그러나 방법 2)에 따라 모든 MPS를 침전시키고자 할 경우, 투명용액의 온도를 60 내지 70℃로 올리고, 전기영동적으로 측정한 MPS의 중량과 동일한 양의 암모늄염의 양을 가하고 탈이온수로 혼합물을 희석시켜용액의 물농도를 0.4M로 낮춘다.

5내지 12시간 동안 방치한 다음, 원심분리시켜 침전된 고체 착화합물의 혼합물을 회수한다. 혼합물을 물로 세척하여 과량 암모늄염을 제거하고, 건조시킨다.

단계 f)에 의한 고-순도 DS의 선택적 회수는 암모늄염과의 침전에 방법 1) 또는 2)의 사용여부에 따라 상이하게 수행한다.

DS/디메틸-에틸-세틸 암모늄 에틸설페이트 착화합물을 선택적으로 침전시키고 분리시킬 경우, 상기 착화합물을 10% 에탄올을 함유한 2M CaCl_2 수용액으로 처리한다. DS 착화합물 : 하이드로알코올성 CaCl_2 용액의 중량비는 1 : 5이다. 용액의 pH를 CaCH_3 을 사용하여 7내지 9로 조절하고, 약 1내지 3시간 동안 60내지 80℃로 가열한 다음 여과시킨다.

용액을 정제 단계에 도입하는데, 이 단계는 분자량 커트-오프(molecular cut-off)가 10,000인 20m²나 선형 칼럼내에서 처리하는 것을 특징으로 하고 이를 1 : 10으로 농축시킨 후 1 : 1로 희석시키고, 염 및 나머지 미량의 불순성분이 완전히 제거될 때까지 정제단계를 계속한다. DS는, 용액 : 아세톤의 용적비가 1 : 0.30이 되도록 하는 양이 아세톤으로 처리하거나 용액 : 에탄올 또는 메탄올의 용적비가 1 : 0.5가 되도록 하는 양의 에탄올 또는 메탄올로 처리하여 10 : 1의 농축용액으로부터 침전시킨다. 더마탄 설페이트 침전물은 가벼운 분말 형태이다.

본 방법으로 수득된 DS는, 바람직하게는 중량 : 염류용액 용적의 비가 1 : 100이 되도록 하는 양의 2MNa, K, Li 또는 Mg염화물 용액내에 용해시킴으로써 알칼리염으로 전환한다. 혼합물을 2내지 10시간 동안 교반시키고, 증류수로 1 : 2로 희석시킨 다음, 여과시키고 1 : 0.5비율의 아세톤을 사용하여 침전시킨다.

이 방법에서, 사용된 염류용액에 따라 더마탄 설페이트의 Na, K, Li 또는 Mg염이 수득된다.

암모늄염을 사용한 침전을 단계 e)의 방법 2)에 따라 수행할 경우, 단계 f)의 DS분리 및 정제는 하기 방법으로 수행한다. MPS 암모늄염 착화합물의 혼합물을 약 25℃의 온도에서 약 1내지 2시간 동안 아세톤에 분산시킨다.

DS착화합물은 아세톤에 선택적으로 용해되고, 다른 착화합물은 용해되지 않은 상태로 남아있어 분리처리를 수행하여 분리시킨다. 사용되는 아세톤의 양은 DS 착화합물을 완전히 용해시키는데 중요하다. 처리된 혼합물의 10%의 DS착화합물을 함유하는 경우, (처리된 착화합물의 용적에 대하여)아세톤 1용적을 가하고, 혼합물이 20%의 DS착화합물을 함유하는 경우는 아세톤 2용적을 가한다. 즉 언제나 주어진 DS 함량비에 따라 아세톤 용적을 사용한다.

용매로 처리시킨 혼합물을 원심분리시키거나 여과시킨다. 투명한 아세톤 여액을 주위온도에서 0.25 내지 1의 염류용액에 대한 아세톤 추출물의 용적비로, 3M의 염류용액(Na,K,Li 또는 Mg염화물)으로 처리한다.

이러한 조건하에서 DS암모늄 착화합물은 분리되고 사용된 염류용액에 따라 Na, K, Li 또는 Mg염의 형태로 침전된다.

모든 경우에, 본 명세서에 기재된 단계 f)에서 생성된 DS염의 특성은 다음과 같다.

-각종 완충시스템내에서의 전기영동 분석시 단일밴드

-분자량 : 20,000내지 40,000

-유기황 : 6내지 8%

-우론산 : 30내지 36%

-카복실 그룹에 대한 설페이트 그룹의 비 : 1.2 내지 1.5

-갈락토사민에 대한 우론산의 비 1 : 1

-이두론산 : 총우론산의 80 내지 90%

- $[\alpha]_D$: -60° 내지 -65°

-헤파린 활성 : 10u/mg USP

본 발명의 제조방법을 사용함에 있어, DS수율은 본래의 기관 또는 조직에 따라 변하고, 원료 물질 10,000kg당 1내지 8kg이다.

출발물질내에 존재하는 MPS를 회수하고자 할 경우, 사용되는 방법은, 바람직하게는, 단계 e)의 방법 2), 즉, 암모늄염 착화합물로서 총 MPS침전에 의한 것이다.

선행 단계 f)에 기술된 바와같이 DS 착화합물을 아세톤으로 용해시킨 후에 용해되지 않은 매스를 증류수 2용적에 분산시켜 아세톤 잔사를 제거하고, 원심분리시킨 다음 아세톤에 대해 기술된 방법을 따라 에탄올에 용해-현탁시킨다. 헤파린-설페이트를 이 방법으로 분리한다.

에탄올에 용해되지 않고 남아있는 매스로부터, 다른 용매에 대해 기술된 똑같은 방법을 사용하고, 순수한 헤파린은 메탄올로 처리하여 추출시킨다.

본 발명의 제조공정에 의해 수득된 더마탄 설페이트의 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘 또는 마그네슘염들은 이른바 헤파린 조인자 II를 활성화 하는데 생물학적으로 활성(약 $60 \mu A$ 11a/mg)이 있지만, 부분 트롬보플라스틴 활성 기간중에 항응고작용의 작용이 전혀없고 미약한 인자 Xa 억제활성(약 20UA Xa/mg)을 갖는다.

생체내에서, 생성물은 독성이 없고 출혈을 일으키지 않으나, 상당한 혈관확장을 유발하는 것으로 보여진다. 또한 정맥내, 피하 및 회장내로 투여할 경우 실험적으로 혈전을 형성하는 것을 억제하는 작용이 있고, 아드리아마이신의 투여로 일어나는 손상으로부터 동물들을 부분적으로 보호할 수 있다.

표 재생 정맥순환의 혈전중에 의해 생기는 질환에 생성물을 국소투여하면 섬유소 용해 및 소염작용에 의해 증세가 급속한 차도를 보인다.

본 발명의 제조공정에 의해 수득된 DS는 하기에 기재된 바와같이 실험동물에서 동물학적으로 및 약물학적으로 평가된다.

[급성독성]

급성독성은 스위치 마우스(Swiss mouse)에 본 발명의 제조공정으로 수득한 더마탄 설페이트를 경구, 정맥내, 복강내 및 피하로 투여한 후 평가한다.

상대적인 LD₅₀ 치는 표 1에 기재되어 있고, 이는 더마탄 설페이트가 급성독성이 낮음을 보여준다.

[표 1]

더마탄 설페이트의 급성독성

투 여 방 법	LD ₅₀ mg/kg
정맥내	2700
피 하	3600
복강내	>5000
경 구	>5000

DS의 독성은 5주동안 위스타 쥐에게 경구 및 근육내로 반복투여한 후 평가한다. 생성물을 매일 상이한 그룹의 쥐에게 200mg/kg/day의 용량으로 경구투여하고 20내지 40mg/kg/day의 용량으로 근육내 투여한다.

생리학적 용액을 경구 및 근육내로 각각 투여하여 처리한 두 그룹의 쥐를 대조군으로 사용한다.

처리기간중, 부형제만으로 처리한 그룹의 쥐들과 비교하여 DS로 처리한 그룹의 쥐들에게는 행동면, 중량 또는 사료소비 변화가 전혀 일어나지 않은 것으로 관찰되었다.

처리가 끝난 후 쥐들을 에테르로 마취시켜 참수시킨다. 근육내 투여로 처리한 쥐들은 주사시에 전혀 변화되지 않은 것으로 나타났다. 혈액학적, 혈액화학적 또는 요 변수에 중요한 변화는 없었다. 40mg/kg의 용량으로 근육내 투여처리한 쥐들에게서 비장의 중량이 약간 증가했으나 조직학적 검사에서는 비장구조에는 전혀 손상이 없는 것으로 밝혀졌다.

기관에서 더 이상의 변화는 관찰되지 않았다.

[항혈전 작용]

DS 의 항혈전 작용은 두 가지 실험 혈전증 모델로써 평가한다 첫째로, 문헌[참조 : Umetsu T., Sanaik., Thromb. Haemostas., 39, 1978, 74]에 기재된 바와같이 쥐의 동정맥 분로(shunt)에, 정맥 및 동맥의 특성을 혼합하여 혈전을 형성시킨다. 둘째로, 문헌[참조 : Meyers et al.,

Standardization of animal models of thrombosis, 17th Angiologial Symposium, Kitzb hel, Breddin K., Zimmernan. Eds. pp 99, 1983]에 기재된 바와같이 쥐의 대정맥의 결찰에 정맥특성을 가진 혈전을 형성시킨다.

1. 동정맥 분로 : DS항혈전 및 항응고작용의 비교

DS를, 분로내의 순환이 활성화되기 직전에, 정맥내 투여한다. 시험종결시 혈전을 제거하고 중량을 잰다. 혈전을 측정 한 직후 혈액의 일부를 시험관 바닥에 수집하고 시험관벽에 최초로 응고가 형성되는데 걸린시간(총 혈액응고 시간)을 측정한다.

혈전 중량 및 응고시간의 결과는 표 2에 기재되어 있고, 이는 더마탄 설페이트가 강력한 항혈전작용을 나타내는 것을 보여준다. 이점에서, 최소용량(0.125mg/kg/정맥내투여)을 사용해도 혈전의 중량은 상당히 감소한다. 또한 동시에 혈액응고 과정과 관련된 현상에 대한 효과는 덜하다. 이점에서, 응고시간이 차츰 증가하더라도 이는 단지 통계학적이고, 생물학적으로는 중요하지 않으며, 항혈전작용에 효과적인 용량보다 훨씬 더 많은 용량을 필요로 한다.

[표 2]

“생체내”에서의 더마탄 설페이트 항혈전 및 항응고작용의 비교

쥐의 동정맥 분로

용량 mg/kg 정맥내투여	항혈전작용		항응고작용	
	혈전중량	억제율 %	응고시간 초	증가율 %
0	131.3±11.7	—	119.2± 4.0	—
0.12	90.5± 5.9**	31	112.5± 8.5	—
0.25	85.5± 3.2**	35	125.7± 7.5	5
0.50	59.0± 5.2**	55	132.5±10.3	11
1.00	53.4± 4.9**	59	132.1± 5.1	11
2.00	43.9± 2.8**	67	141.3± 8.3°	19

** P 0.001

° P 0.05

2. 대정맥의 결찰 : 상이한 투여방법의 비교

DS를 결찰 10분전에 정맥내로, 결찰 1시간 전에 피하로, 그리고 결찰 15분 전에 회장내로 투여한다. 시험 종결시 혈전을 제거하고 중량을 잰다.

결과는 표 3에 기재되어 있고, 이는 DS가, 정맥내, 피하 또는 회장내로 투여할 경우, 쥐의 대장 결찰에 의해 유도된 혈전증을 억제하는 작용이 있음을 보여준다. 예비평가로 용량-효과 곡선을 얻을 수 있는데, 여기에서 정해진 시간에서 3가지 투여방법, 즉, 정맥, 피하 및 회장내로 투여할 경우 현(subtend)면적의 비는 1 : 4 : 16이다.

[표 3]

쥐의 대정맥의 결찰에서 더마탄 설페이트의 항혈전작용. 상이한 투여방법의 비교

mg/kg	정맥내 투여 혈전 억제율 중량 %	mg/kg	피하 투여 혈전 억제율 중량 %	mg/kg	회장내 투여 혈전 억제율 중량 %
0	2.29± 0.43	0	4.58± 0.50	0	3.20± 0.42
0.5	1.14± 0.31	2.5	1.10± 0.60	10	0.99± 0.39
1.0	0.80± 0.32	5.0	0.63± 0.29	20	0.43± 0.24
2.0	0	10.0	0	40	0

또한, 본 발명은 표 면상 및 심화된 혈전증의 치료에 유용한 더마탄 설페이트의 정해진 양을 함유하는 약제학적 제형(바이알, 정제, 캡슐제, 연고, 시럽제, 좌약, 드롭제 등)에 관한 것이다.

제형들의 예는 다음과 같다.

-20-50-100-200mg의 DS를 함유하는 캡슐제

-20-50-100-200mg의 DS와 약제학적 분야에서 통상 사용되는 부형제, 탈응집제 등을 함유하는 정제

-20-50-100mg의 DS와 수성부형제를 함유하는 바이알 :

-20-50-100-200mg/ml의 DS와 약제학 분야에서 통상 이요되고 있는 수성부형제, 보존제 등을 함유하는 드롭제

-20-50-100-200mg의 DS와 약제학 분야에서 통상 사용되는 부형제를 함유하는 좌약 :

-20-50-100-200mg/g의 DS 와 약제학 분야에서 통상 사용되는 부형제를 함유하는 연고

제조공정의 실제적인 양태는 본발명에 따른 제조공정을 더 용이하게 재현시킬 수 있도록 하기에 기재한다.

[실시예 1]

동결시킨 소 및 돼지의 소장점막 10,000kg을 초미분화하고 0.01M CaCl_2 수용액 5000 ℓ 를 함유한 반응기내로 옮긴다.

매스를 완전히 균질화 될 때까지 70rpm으로 교반시킨후, pH를 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 용액을 사용하여 7로 조절하고 45°로 가열한다.

물 50l중의 알칼리아제 균질물 10kg을 가하고, 혼합물을 연속 교반시키면서 12시간동안 45℃ 온도로 유지시킨다. 이어서, 염산을 pH4에 이를 때까지 유동성 매스에 가한 후, 30분 동안 가열한다.

용액을 셀라이트로 제조된 압축여과기(filter press)를 통해 여과시키고, 투명용액을 반응기내로 옮긴 다음 정화카드가 장치된 압축기(press)를 통해 여과한다. 총 투명 용액 약 12,000리터를 수득하고, 이 용액에, 물 100리터에 용해된 디메틸-에틸-세틸 암모늄 에틸설페이트 10리터를 교반시키면서 조금씩 가한다.

6시간 동안 방치한후, 투명 용액을 가만히 따르고 토니아티(Toniatti) 원심분리기로 10000rpm으로 원심분리하여 잔사를 회수한다.

수집한 착화합물을, 에탄올 100 ℓ 를 함유한 2M CaCl_2 용액 1000 ℓ 에 붓는다. 포화 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 용액을 가해서 pH를 약 8로 조절하고 천천히 교반시키면서 약 2시간동안 80℃로 가한다. 여과보조제 10kg을 가한후, 용액이 투명해질 때까지 혼합물을 압축기를 통해 여과시킨다. 액체 (케익)을 세척한 후 1200리터를 분자량 커트-오프가 10,000인 나선형 칼럼(20cm²)을 통해 한외여과한다. 200리터로 농축시킨 후, 1000리터로 희석시키고 다시 약 100리터로 농축시킨다. 이러한 조작을 투과액이 Ca염에 대해 실제로 음성일 때까지 계속한다.

아세톤 30리터를 용액에 가해 DS를 침전시킨다. 침전물을 수거하고, 아세톤으로 세척한 다음 건조시킨다.

수득량 : 무수분말 형태로 8kg

분말을 2M NaCl 용액 (12%) 80 ℓ 중에서 1시간동안 교반시킨 후, 용액을 150리터로 희석시키고, 여과시킨 다음 무수아세톤 45리터를 가하여 침전시킨다.

침전물을 압축여과기로 수집하고, 40%아세톤 수용액으로 세척한 다음 진공하에 건조시킨다.

수득량 : DS나트륨염 7kg

분말을 탈이온수 100 ℓ 에 용해시키고, 음이온성 수지상에 통과시켜 탈색시키고, 밤새 고온 조건하에서 탈발열성화 시키고 1 : 1의 비로 아세톤으로 침전시키고, 여과시키고 동결건조시킨다.

수득량 : 하기와 같은 특징의 DS 4kg

-분자량 35,000

- $[\alpha]_D^{25}$

-카복실 그룹에 대한 설페이트 그룹의 비 1.25

-갈라토사민에 대한 우론산의 비 1 : 1

-전기 영동 분석시 단일 밴드

[실시예 2]

소의 체장 및 허파에서 수득한, 아세톤 -처리분말 1000kg을 0.01M CaCl_2 수용액으로 초미분화 시키고, 0.01M CaCl_2 용액을 사용하여 20,000리터의 용적으로 희석시킨다.

약 30분동안 혼합한 후 45℃로 유지시킨다.

실시예 1에 기술한 것과 동일한 과정으로 수행한다.

수득량 : 다음과 같은 특징의 DS 5kg

-분자량 40,000

- $[\alpha]_D^{65}$

-카복실 그룹에 대한 설페이트 그룹의 비 1.2

갈락토사민에 대한 우론산의 비 1 : 1

-전기영동 분석시 단일밴드

분무-건조시켜 수득한 상기 기관의 분말을 출발물질로 사용할 경우 과정 및 결과는 동일한다.

[실시예 3]

동결시킨 신선한 동물기관(허파, 혈관 및 소장)의 혼합물 100kg을 분쇄시켜 펄프를 얻고 이를 0.01M CaCl_2 용액 50 l 를 함유한 반응기 내로 넣는다.

매스를 완전히 균질화 될 때까지 교반시킨 다음 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 사용하여 pH를 7.2로 조절하고, 50℃로 가열한다.

수퍼라아제 0.05중량%을 함유한 효소용액 200 l 를 50℃로 가열한 다음 가한다.

혼합물을 8시간 동안 50℃에서 교반시킨다. 이 시한후에 분해는 완결된다. 혼합물을 HCl을 사용하여 pH5로 산성화시키고, 80℃로 가열한 다음 여과보조제로 필터 접지를 사용하여 고온 조건하에 여과시킨다.

여액 시료를 분석하여, 특히 다음 단계에서 이용될 4급 암모늄 : 여액 10ml를 1ml로 농축시키고 이어서 증류수를 가하여 총 2ml용적으로 만든다. 바륨아세테이트 및 아세트산으로 구성된 완충용액내의 전기영동을 위해 3%아가로우즈 판을 따로 준비한다. 실험 중에 시료 5내지 10 μl 를 판위에 놓고 1차 전기영동을 15볼트/cm(약 120볼트)로 수행한다. 이어 2차 전기영동을 동일조건하에 프로판디아민 완충 용액내에서 수행한 다음 적외선원으로 판을 건조시킨다. 2% 톨루이딘 블루로 염색시키고 5%아세트산으로 탈색시킨다.

이 지점에서 광밀도 판독(photodensitometric reading)을 수행하고, 개별 MPS 면적을 참조 표 준물과 비교하여 측정한다.

MPS의 분석 측정 결과 총 200g인 것으로 나타났으며, 더마탄설페이트 함량을 50g이었다. 총 200g이다.

분석자료를 기준으로 하يام인 200g을 여액에 가한다.

이를 1시간 동안 70℃에서 교반시키고, 탈이온수로 희석한 후 용액의 물농도를 0.4M으로 조절한다.

5시간동안 방치하고, 4급 암모늄과 MPS 착화합물과의 혼합물 형태의 침전물을 원심분리시켜 회수한다.

버터 모양의 이 침전물을 우선 물로 세척하여 과량의 염을 제거한 후, 아세톤 1리터를, 현탁액을 3시간 동안 교반하에 주위온도로 유지시키면서, 가하여, 더마탄 설페이트 착화합물을 선택적으로 용해시킨다. 현탁액을 원심분리하여 약 DS용액 1리터를 수득하고 여기에 3MNaCl 용액 2리터를 가한 다음 아세톤 2리터를 가하고, 침전된 DS를 원심분리에 의해 분리시키고 에탄올로 세척한 다음 건조시킨다.

이 방법으로 다음과 같은 특성의 DS 50g을 수득한다.

-분자량 35,000

- $[\alpha]_D^{60}$

-카복실 그룹에 대한 설페이트 그룹의 비 1.5

-갈락토사민에 대한 우론산의 비 1 : 1

-전기영동 분석시 단일밴드

[실시예 4]

실시예 3에서 기재된 바와같이 MPS 혼합물을 처리시켜 수득한 DS 착화합물을 선택적으로 용해시켜 생성된 잔여 고체물질을 증류수 500ml중에 분산시켜 아세톤 잔사를 제거하는데, 이때 원심분리시켜 물도 함께 제거한다.

불용성 침전물을 에탄올 1.8리터로 처리하고, 수득한 현탁액을 3시간동안 교반하에 50℃로 유지시켜, 헤파린 설페이트 착화합물을 선택적으로 용해시킨다.

헤파린 설페이트를 수득하는 후속 과정은 실시예 3의 더마탄 설페이트에 대해 기재된 바와같이 수행한다.

다음과 같은 특성의 헤파린 설페이트 60g을 수득한다.

-분자량 30,000

$[\alpha]_D^{+55}$

-전기 영동 분석시 단일 밴드

[실시예 5]

실시예 4에 기재된 바와같이 처리하여 수득한 헤파린 설페이트 착화합물을 선택적으로 용해시켜 생성된 잔여 고체물질을 증류수 3ℓ 중에 분산시켜 메탄올 잔사를 제거한 다음, 원심분리시킨다.

불용성 침전물을 메탄올 5ℓ로 처리하고, 수득한 현탁액을 3시간동안 교반하에 50℃로 유지시켜 헤파린 착화합물을 용해시킨다.

헤파린을 수득 및 정제하는 후속과정은 실시예 3의 DS에 대해 기재된 바와같이 수행한다.

이 방법으로 약제학적으로 순수한 헤파린 50g을 수득한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

a) 신선한 동물의 기관을 그대로 또는 분말의 형태로 동결시켜 안정화시키고, b) MPS를 함유한 안정한 원료 물질을 CaCl_2 수용액을 함유한 균질물을 알칼리성 pH 및 저온에서 단백질 분해효소로 분해시키고, d) 분해물을 산성화하고, 가열한 다음 여과시키고, e) 여액을, 이와 착화합물을 형성할수 있는 4급 암모늄염으로 처리하여 DS 단독으로 또는 모든 MPS를 선택적으로 침전시키고 f) DS를 함유한 암모늄 착화합물로부터 DS를 회수하고 정제시킴을 특징으로 하여, 무코 다당류(MPS)가 다량 함유된 동물의 기관으로부터 약제학적 순도의 더마탄 설페이트(DS)를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 초미분화를, 동결시킨 기관물질과 0.01M CaCl_2 수용액을 1 : 1의 중량비로 혼합하여 수행하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 초미분화를 동결시킨 기관물질과 1M CaCl_2 수용액을 1 : 1의 중량비로 혼합하여 수행하고, 매스를 냉아세톤을 반죽처리하여 여과한 다음, 마지막으로 건조시키는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 초미분화를 동결시킨 물질과 0.1M CaCl_2 수용액을 1 : 1의 중량비로 혼합하여 수행하고, 수득한 혼합물을 150℃미만의 온도에서 공기로분무-건조시키는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 초미분화를 동결시킨 물질과 10% 솔비톨을 함유한 1M CaCl_2 수용액을 1 : 1의 중량비로 혼합하여 수행하고, 수득한 혼합물을 동결건조시키는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 단백질 분해효소에 의한 분해를, 물로 희석시킨 초미분화된 혼합물에 효소를 가하고, pH를 7내지 9로 조절하고 40내지 55℃로 가열하여 수행하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 효소를 1 : 0.0001내지 1 : 0.001의 원료물질 : 효소의 중량비로 가하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, pH를 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 사용하여 7내지 9로 조절하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 분해물을 pH3 내지 6으로 산성화 시키고 70내지 90℃로 가열하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 분해물을 HCL을 사용하여 산성화시키는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 여과된 분해물을 디메틸-에틸-세틸암모늄 에틸설페이트로 처리하여 DS 착화합물을 선택적으로 침전시키는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 여과된 분해물을 60내지 70℃의 온도에서 하리아민, 세틸-트리메틸 암모늄 브로마이드 및 세틸-디메틸-에틸 암모늄 브로마이드로 이루어진 그룹중에서 선택된 4급 암모늄 염으로 처리하여 존재하는 모든 MPS를 착화합물 형태로 침전시키는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, DS착화합물을, 아세톤을 사용하여 선택적으로 용해시키는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, DS를, 암모늄 착화합물을 10%에탄올-함유 2M CaCl_2 수용액으로 처리하고, pH를 7내지 9로 조절한후, 60내지 80℃로 가열함으로써, 암모늄 착화합물로부터 회수하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, DS를, 암모늄 착화합물을 염류용액에 대한 아세톤 추출물의 용적비가 0.25 내지 1이 되도록 하는 양의 3M염류용액으로 처리시킴으로써, 암모늄 착화합물로부터 회수하는 방법.

청구항 16

제12항 또는 제13항에 있어서, 아세톤으로 처리하여 생긴 잔사를 에탄올로 처리하여 헤파란 설페이트 착화합물을 선택적으로 용해시키는 방법

청구항 17

제16항에 있어서, 에탄올로 처리하여 생긴 잔사를 메탄올로 처리하여 헤파린 착화합물을 선택적으로 용해시키는 방법.