

ELJÁRÁS NAGY MOLEKULATÖMEGŰ N,O-SZULFATÁLT HEPAROZÁNOK
ÉS E VEGYÜLETEKET TARTALMAZÓ GYÓGYÁSZATI KÉSZÍTMÉNYEK
ELŐÁLLÍTÁSÁRA

64087

ELF SANOFI, Párizs, Franciaország

A bejelentés napja: 1992. 11. 27.

Elsőbbsége: 1991. 11. 28. (9114725)

Franciaország

K I V O N A T

A találmány szerinti eljárással új, $1,5 \times 10^4$ és $4,0 \times 10^6$ dalton közötti molekulatömegű láncokból vagy azok keverékéből álló N,O-szulfatált heparozánokat és gyógyászati szempontból elfogadható sóit állítják elő. E heparozánok láncai az (I) általános képletű, ismétlődő diszacharid-egységet tartalmazzák, ahol az (I) képletben

E a fenti N,O-szulfatált heparozánok diszacharid-egységeinek 0-80%-ában acetilcsoportot, míg a többi diszacharid-egységben szulfátcsoportot vagy adott esetben hidrogénatomot jelent; és

G jelentése hidrogénatom vagy szulfátcsoport.

A találmány szerinti N,O-szulfatált heparozánok érfal-megbetegedések, túlzott véralvadékonyság (hiperkoagulabilitás) megelőzésére és/vagy gyógyítására, valamint a véralvadás szabályzására alkalmazhatók.

Sz. J. O. 92

P92 3757

Közzététel: példány

21414

A

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA Kft.

Budapest

NSZ 05

CO8 B37/10

AG 1K 31/725

64087

ELJÁRÁS NAGY MOLEKULATÖMEGŰ N,O-SZULFATÁLT HEPAROZÁNOK
ÉS E VEGYÜLETEKET TARTALMAZÓ GYÓGYÁSZATI KÉSZÍTMÉNYEK
ELŐÁLLÍTÁSÁRA

ELF SANOFI, Párizs, Franciaország

Feltalálók:

LORMEAU Jean-Claude, Kremlin Bicetre,
CHEVALLIER Bruno, Villejuif,
SALOME Marc Louis Victor, Castanet-Tolosan,
Franciaország

A bejelentés napja: 1992. 11. 27.

Elsőbbsége: 1991. 11. 28. (9114725)

Franciaország

76197-2709 TEL-Sch

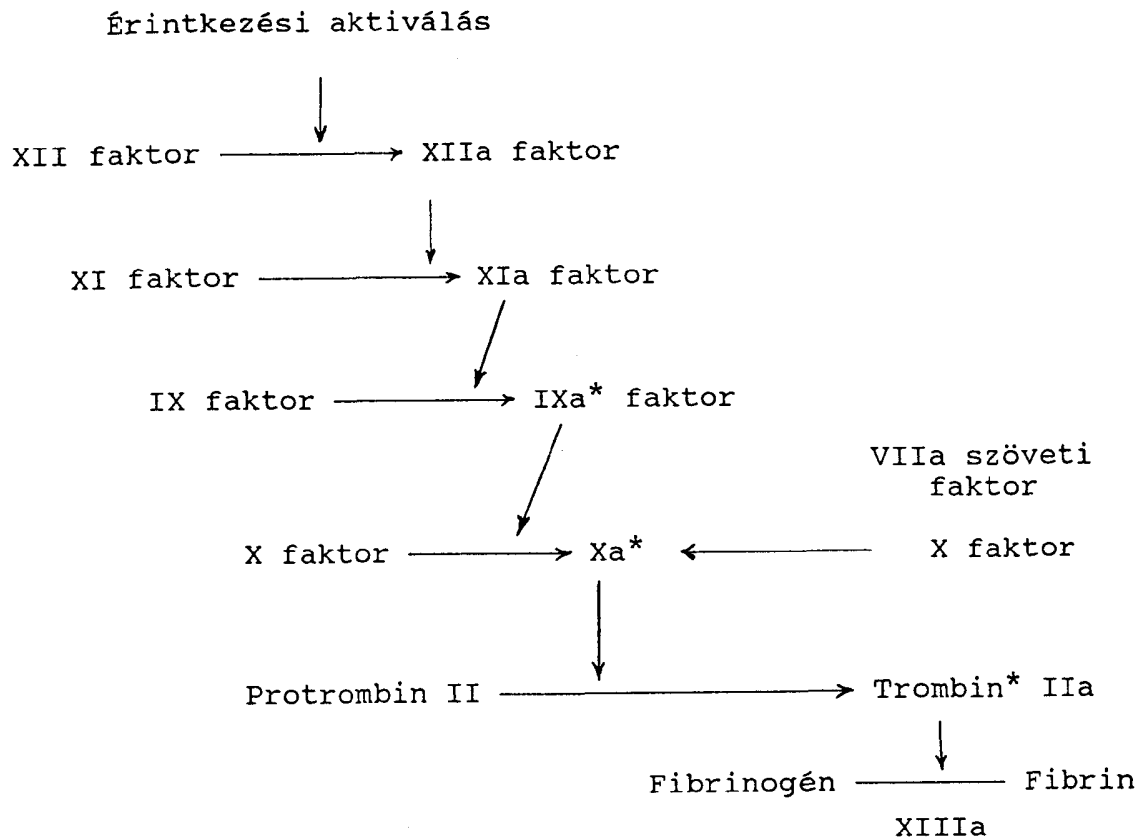
A találmány új, nagy molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánokra, e vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítményekre, valamint e vegyületek és készítmények előállítására vonatkozik.

Ismert, hogy a glikóزامino-glikánok állati szövetek extrakciójával előállítható termékek. Egyes glikóزامino-glikánok igen előnyös véralvadásgátló és antitrombotikus (trombózis elleni) hatást fejtenek ki. E vegyületcsalád jellegzetes tagjai a heparin, hasítási termékei és ezek származékai, valamint a heparán-szulfát és a dermatán-szulfát, amelyek hátránya azonban, hogy - eredetük következtében - nagyon költségesek.

Közelebbről ismeretes, hogy a dermatán-szulfátok különböző polimerizációs fokú polimerek családját alkotják; e vegyületek egy uronsavcsoportból (iduronil- vagy glükuronilcsoportból) és egy acetilezett, 4-szulfatált galaktóزامinilcsoportból álló egységek ismétlődésével épülnek fel [H. W. Stuhlsatz: "A kötőszövetkutatás módszertana" (angolul), 137-146 (1976)]. A természetes dermatán-szulfát molekulatömege 2×10^4 és 4×10^4 dalton (az alábbiakban rövidítve: D) között van. E termék különösen kedvező véralvadásgátló és antitrombin hatással rendelkezik [F. Fernandez és munkatársai: British Journal of Haematology 64, 309-317 (1986)].

Ismert továbbá [I. Björk és U. Lindahl: "Molekuláris és sejtbio kémia" (angolul), kiadó: Publishers; Dr. W. Junk (1982, Hollandia)], hogy a véralvadás összetett fiziológiai jelenség, amelynek mechanizmusát a következőképpen vázolhat-

juk, illetve összegezhethük:



Egyes serkentő tényezők (stimulusok), így a kontakt (érintkezési) aktiválás és szöveti faktorok kiváltják a vérplazmában jelenlévő véralvadási faktorok sorozatának egymást követő aktiválását (ezeket a faktorokat a fenti vázlatban római számokkal jelöltük; az "a" jelenléte az aktivált formát jelenti, ha "a" nincsen, akkor inaktivált alakról van szó).

Bármilyen a stimulus (kiváltó tényező) jellege, a végső lépések azonosak: az Xa faktor aktiválja a II faktort (amelyet protrombinnak is neveznek), mely aktivált alakjában (IIa faktor, amelyet trombinnak is neveznek) kiváltja az

oldható fibrinogén részleges proteolízisét, s így oldhatatlan fibrint szabadít fel, amely a véralvadék fő alkotórésze.

Normális fiziológiai körülmények között szabályzó fehérjék - így az antitrombin-III (ATIII) és a II heparin-kofaktor (HCII) is jelen vannak a plazmában.

Az antitrombin-III gátló hatást fejt ki a fenti vázlatban *-gal jelölt véralvadási faktorokra. Ez a gátló hatás igen erősen hangsúlyos heparin vagy heparin-típusú szintetikus oligoszacharidok jelenlétében [D. H. Atha és munkatársai: *Biochemistry* 24, 6723-6729 (1985)].

A II heparin-kofaktor csak a IIa faktort (a trombint) gátolja, amely a véralvadás utolsó lépését katalizálja. Ez a hatás erősen kifejezett heparin vagy dermatán-szulfát jelenlétében [D. M. Tollefsen: *J. Biol. Chem.* 258, 6713-6716 (1983)].

Az Xa és IIa faktor gátlása előnyös lehetőséget kínál véralvadásgátló (antikoaguláns) és antitrombotikus hatás megvalósítására, mivel ez a két faktor a véralvadás utolsó két lépésében vesz részt, amelyek a véralvadást kiváltó stimulustól függetlenek.

A IIa faktor szelektív gátlásának megvalósítására különösen előnyös lehetőség adódik a II heparin-kofaktor specifikításában, valamint gátló hatásának erősítésében. A legérélyesebb, ilyen típusú erősítő hatással rendelkező ismert termék a dermatán-szulfát.

Az is ismeretes, hogy a heparin főlánc két lépésben alakul ki. A bioszintézis első lépésének prekursor anyaga

egy proteoglikán, amelynek poliszacharidrésze olyan polimerek együtteséből áll, amelyek ismétlődő β -D-glükuronil-1,4- α -N-acetil-D-glukózaminil-(1,4)-diszacharid-egységek különböző fokú polimerizációjával épülnek fel. Ezt a poliszacharidrészt általában N-acetil-heparozánnak nevezik [J. Navia: Anal. Biochem. 135, 134-140 (1983)]. A bioszintézisnek ez az első lépésében beszélhetünk csupán "diszacharidegységről", mivel a bioszintézis második lépése mélyen megváltoztatja ezt az egyszerű alapvázat [J. P. Duclos: "A heparin: gyártása, szerkezete, sajátosságai és elemzése" (franciául) kiadó: Masson, 81-83 (1984, Franciaország)].

Valójában a bioszintézisből eredő természetes heparin olyan poliszacharid, amely adott esetben 2-helyzetben szulfatált glükuronsav és iduronsav (uronsavak) molekuláinak és adott esetben 6-helyzetben szulfatált és a 2-helyzetű aminos csoporton szulfatált vagy acetilezett glükózamin molekuláinak a kombinációjából áll.

Ismert továbbá, hogy egyes Escherichia coli fajhoz tartozó baktériumok kapszuláris poliszacharidot termelnek, amelynek általános jelölése K5 antigén; ez az antigén olyan polimerek együttese, amelyek β -D-glükuronil-1,4- α -N-acetil-D-glükózaminyl-(1,4)-egységek ismétlődésével épülnek fel [W. F. Vann és munkatársai: Eur. J. Biochem. 116, 359-364 (1981)].

Ezt a poliszacharidot - amelynek kémiai jellege a heparin proteoglikán prekursorának poliszacharidrésszével azonos - ebben a leírásban N-acetil-heparozánnak nevezzük. E termék

molekulatömege 10^5 és $2,0 \times 10^6$ között van, és "uronsav"-egységként csupán D-glükuronsavat tartalmaz [W. F. Vann és munkatársai: Eur. J. Biochem. 116, 359-364 (1981); továbbá lásd a 0 333 243 számú publikált európai szabadalmi bejelentést].

Az 0 333 243 számú publikált európai szabadalmi bejelentésben leírják az O-szulfatált K5 poliszacharidot (azaz az O-szulfatált N-acetil-heparozánt), valamint egyes hasítási termékeit, amelyek 4, 6 vagy 8 - hasonlóképpen O-szulfatált - "cukor" egységből tevődnek össze. E termékeknek antiangiógén (érképződés elleni) és daganatgátló (antitumor) hatása van, és e hatásaiknak a véralvadásgátló sajátságaikhoz viszonyított aránya kedvező. Ugyanebben a leírásban közlik az N-acetil-heparozán hasítási termékeit is, amelyek 4, 6, 8, illetve 10 "cukor" egységből állnak; valamint nagy molekulatömegű O-szulfatált N-acetil-heparozánt is ismertetnek. Ez utóbbi termékek erélyes körülmények közötti depolimerizálása W. F. Vann és munkatársai módszerével [Eur. J. Biochem. 116, 359-364 (1981)] kis molekulatömegű hasítási termékeket eredményez, amelyek 8, 6, illetve 4 "cukor" egységből állnak, amint ezt a 0 333 243 számú publikált európai szabadalmi bejelentésben közlik.

Az utóbb idézett szabadalmi bejelentésben leírják továbbá egy O-szulfatált N-acetil-heparozán szerkezetű pentaszacharid előállítását teljesen szintetikus úton.

Ismeretes továbbá, hogy az N-dezacetilezett, N-szulfatált K5 poliszacharid szubsztrátumként alkalmazható olyan

enzimek számára, amelyek a heparin bioszintézise során a polimer végső, módosító reakcióit katalizálják; e módosító reakciók: a hexuronozilcsoport C-5 epimerizálása és az O-szulfatálás [M. Kusche és munkatársai: Biochem. J. 275, 151-158 (1991)]. M. Kusche és munkatársai leírják az N-dezacetilezett, N-szulfatált K5 poliszacharid előállítását olyan úton, hogy előbb hidrazin és hidrazin-szulfát alkalmazásával N-dezacetilezést végeznek, majd az így kapott, N-dezacetilezett terméket trimetil-amin és kén-trioxid komplexével N-szulfatálják.

Ismert végül, hogy a C-5 epimerizált, N-dezacetilezett, N-szulfatált K5 poliszacharid parciális 5-epimerizálásával és O-szulfatálásával olyan termékek állíthatók elő, amelyek Xa faktor elleni és IIa faktor elleni hatással rendelkeznek a HCII útján, amely a nyálkahártya-heparin és a heparán-szulfát típusa között van [B. Casu és munkatársai: "Nemzetközi szimpózium a heparin és rokon poliszacharidok tárgyában" (angolul), Uppsala, 1991. szept. 2-6, 12. számú Kivonat]. Mindezek a termékek a heparinhoz hasonlóan láncikaikban mind glükuron-, mind iduron-szerkezetű egységeket tartalmaznak. A K5 poliszacharid C-5 epimerizált, N-dezacetilezett, N-szulfatált származékait - amelyek láncikaikban mind glükuron-, mind iduron-egységeket tartalmaznak - szintén közlik M. Kusche és munkatársai [Biochem. J. 275, 151-158 (1991)].

J. Riesenfeld és munkatársai egy vizsgálatukkal kapcsolatban, amelynek célja a heparin bioszintézisének felderí-

tése, ismertetik az N-acetil-heparozán szulfatálását egy enzimmel, azonban nem írják le a kapott termékek pontos szerkezetét.

A 2 584 728 számú francia szabadalmi leírásban (benyújtották 1987. november 10-én, megfelel a 85.10787 számú francia szabadalmi bejelentésnek) eljárást közölnek glikóزامينو-گليكأنوك szulfatálására, és különösen heparin szulfatálására; ez az eljárás lehetővé teszi kénsav-észter-csoportok ($-SO_3^-$ -csoportok) bevezetését a kiinduló glikóزامينو-گليكأنوك primer hidroxilcsoportjaira a kiinduló anyag polimerizációs fokának vagy homogenitásának változása nélkül.

Azt találtuk, hogy az N-dezacetilezett, N-szulfatált K5 poliszacharid O-szulfatálásával olyan, nagy molekulatömegű N,O-szulfatált heparozán állítható elő, amely véralvadás ellen kedvező hatást mutat, és ez a hatás a II heparin-kofaktor, valamint - ami meglepő - az antitrombin III faktor útján érvényesül. Közelebbről, váratlanul úgy találtuk, hogy a parciális 5-epimerizálás nem szükséges, és hogy az N,O-szulfatált heparozánok - amelyek láncaikban a glükóزامينو-گليكأنوك-egységeken kívül csupán glükuronsav-egységeket tartalmaznak - véralvadásgátló és trombózis elleni készítmények (gyógyszerek) hatóanyagaiként alkalmazhatók.

A jelen találmány szerinti nagy molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánok tehát a többi, az irodalomban eddig leírt termékektől új szerkezetükben különböznek, amelyre különösen jellemzők: a nagy mértékű szulfatálás (a glükóزامينو-گليكأنوك aminos-csoportjának a szulfatálása is), továbbá az iduronsav szer-

kezeti egység hiánya, valamint előre nem várt farmakológiai sajátosságai. A II heparin-kofaktorra (HCII) vonatkoztatott véralvadásgátló hatásuk erősebb, mint a dermatán-szulfáté. Valóban, farmakológiai hatásai a gyógyászatban alkalmazott glikóزامino-glikánok hatékonyságához - különösen a heparinéhoz - hasonlítható, s ezért a véralvadás szabályzására alkalmazhatók. A találmány szerinti termékek konkrétan anti-trombin hatóanyagokként alkalmazhatók.

A jelen leírásban a K5 poliszachariddal, annak N-dezacetilezett, N-szulfatált származékaival, valamint az N,O-szulfatált heparozánokkal kapcsolatban - amelyek a jelen találmány tárgyát képezik - a "nagy molekulatömegű" kifejezés annyit jelent, hogy az adott molekulatömeg $1,5 \times 10^4$ D-nál nagyobb, tehát túl esik azon a határon, amelyen belül egy molekulatömeg a szabványos analitikai módszerek segítségével bizonyos pontossággal meghatározható. Ha a természetes K5 poliszacharidra és annak származékaira hivatkozunk, akkor ezen azt értjük, hogy molekulatömegük a W. F. Vann és munkatársai fentebb idézett közleményeiben megadott érték [Eur. J. Biochem. 116, 359-364 (1981)] és a 0 333 243 számú publikált európai szabadalmi bejelentésben megadott érték, ha erre vonatkozóan külön megjegyzést nem teszünk. Ezzel szemben ez a megjelölés olyan termékekre is vonatkozik, amelyek molekulatömege a természetes K5 poliszacharidénál kisebb, s amelyek $1,5 \times 10^4$ és 10^5 D molekulatömegű láncok hasításával és/vagy lebontásával állíthatók elő. Valójában a "nagy molekulatömegű" megfogalmazást bármely, adott esetben N-dezace-

tilezett, N-szulfatált K5 típusú poliszacharidtermékre - beleértve a hasítási termékeket is - továbbá bármely N,O-szulfatált heparozánra is alkalmazzuk, beleértve a hasítási termékeket is, ha molekulatömegük megközelítőleg $1,5 \times 10^4$ D és megközelítőleg $4,0 \times 10^6$ D között van.

Mindezek alapján a jelen találmány olyan N,O-szulfatált heparozánokra vonatkozik, amelyek $1,5 \times 10^4$ és $4,0 \times 10^6$ D molekulatömegű láncokból, vagy ilyen láncok keverékéből állnak, és e láncokra jellemző az (I) általános képletű, ismétlődő diszacharid-egység - ahol az (I) képletben

E a fenti N,O-szulfatált heparozánok diszacharid-egységeinek 0-80 %-ában acetilcsoportot, míg a fennmaradó diszacharid-egységekben szulfátcsoportot vagy adott esetben hidrogénatomot jelent; és

G jelentése hidrogénatom vagy szulfátcsoport.

A találmány az (I) általános képletű N,O-szulfatált heparozánok szulfatálási foka - a szulfát/karboxil arányban (hányadosban) kifejezve előnyösen 1,5-től 3,0-ig terjed.

A találmány továbbá azokra az N,O-szulfatált heparozántermékekre is vonatkozik, amelyek legalább 70 tömeg% fentebb leírt, a jelen találmány tárgyát képező N,O-heparozánt tartalmaznak.

A jelen találmány tárgyát képező N,O-szulfatált heparozánok állhatnak azonos, jól meghatározott molekulatömegű poliszacharidláncokból, amelyek molekulatömege az $1,5 \times 10^4$ D és $4,0 \times 10^6$ D közötti tartományban van; vagy állhatnak különböző molekulatömegű láncok keverékéből, amelyek molekulatömege

$1,5 \times 10^4$ D és $4,0 \times 10^6$ D tartományban van. Az ilyen láncok molekulatömegének a szórása többé vagy kevésbé jelentős lehet. Valójában a jelen találmány tárgyát képező N,O-szulfatált heparozánok állhatnak olyan láncokból, amelyek molekulatömegének különbsége egymástól legfeljebb megközelítőleg $3,9 \times 10^6$ D; vagy - ellenkezőleg - állhatnak csupán olyan láncokból, amelyek molekulatömegének különbsége egymástól megközelítőleg 300 D, amely utóbbi érték megfelel egy uronsav-egységnek (D-glükuronsavnak vagy származékainak) vagy egy glükózamin-egységnek; vagy állhatnak más láncokból, amelyek molekulatömegének különbsége egymástól 300 D-nál kisebb, azon esetben, ha az N,O-szulfatált heparozán kémiai hasításból származik. Nyilvánvaló továbbá, hogy valamennyi N,O-szulfatált heparozántermék esetén a legmagasabb molekulatömegű vagy legkisebb molekulatömegű láncok molekulatömege bármilyen érték lehet $1,5 \times 10^4$ D és $4,0 \times 10^6$ D között. A "megközelítőleg" kifejezés olyan molekulatömegekre utal, amelyek a megállapított értékekhez igen közel állnak, és ezt a kifejezést olyan értelemben használjuk, hogy nincsen korlátozva a konkrétan megadott értékekre. Ezt a kifejezést indokolják azok a nehézségek, amelyek a nagy molekulatömegek kiértékelése és az eredmények szórása következtében a területen jártas egyén számára adódhatnak még abban az esetben is, ha pontosságot biztosító, hatékony mérőmódszert alkalmaz.

Az (I) általános képlettel kapcsolatban a "G jelentése hidrogénatom vagy szulfátcsoport" kifejezés arra utal, hogy

az (I) képletben a G diszacharid-egység egyes helyzetekben hidrogénatomot, a többi helyzetben szulfátcsoportot jelent. Ugyanígy E egyes diszacharid-egységekben acetylcsoportot, a többi diszacharid-egységben szulfátcsoportot vagy adott esetben hidrogénatomot jelent. Ennek következtében az N,O-szulfatált heparozánok diszacharid-egységei nem feltétlenül azonosak.

Az (I) általános képlet egy glükózamin-egységből és D-glükuronsav-egységből álló, ismétlődő diszacharid szerkezeti egységet ábrázol. Ezek az egységek megfordíthatók, közelebbről, ha úgy tekintjük, hogy az (I) általános képletű diszacharid-egység n-szer ismétlődik, és a láncok nem redukáló egysége ugyanúgy lehet vagy egy glükózamin-egység - amint ezt az (I) képlet ábrázolja - 4-helyzetben hidroxilcsoporttal, ahol a glükózamin-egység szulfatálva van vagy nincsen szulfatálva; vagy lehet egy D-glükuronsav, amely adott esetben a C-4 és C-5 között kettős kötést tartalmaz, és szulfatált vagy nem szulfatált. A redukáló egység ugyanígy lehet egy D-glükuronsav-egység, - amint ezt az (I) képlet ábrázolja - az anomer oxigénatomon hidrogénatommal szubsztituálva, vagy lehet egy glükózamin-egység. A találmány szerinti előnyös vegyületek olyan láncokból állnak, amelyek redukáló és nem redukáló végződése: szulfatált vagy nem szulfatált uronsav-egység; szulfatált vagy nem szulfatált glükózamin-egység; vagy szulfatált vagy nem szulfatált N-acetil-glükózamin-egység.

Ugyanúgy, mint a heparin esetében - kivéve, ha erre vo-

natkozóan külön megjegyzést teszünk - a "K5 poliszacharid" és "N,O-szulfatált heparozánok" megjelölések a termékekkel kapcsolatban a termékek nátriumsóira vonatkoznak.

A találmány arra az eljárásra is vonatkozik, amellyel a nagy molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánok előállíthatók. Ez az előállítási eljárás abban áll, hogy

- (i) egy kiinduló anyagot, amely N-dezacetilezett, N-szulfatált K5 poliszacharidból vagy annak valamely hasítási termékéből áll, O-szulfatálási reakciónak vetünk alá; vagy
- (ii) egy kiinduló anyagot, amely N-dezacetilezett K5 poliszacharidból vagy annak valamely hasítási termékéből áll, részleges N,O-szulfatálási reakciónak és adott esetben ezt követő teljes N-szulfatálásnak vetünk alá, majd az így kapott terméket elkülönítjük, és adott esetben gyógyászati szempontból elfogadható sójává alakítjuk.

Kiinduló anyagokként olyan anyagokat alkalmazunk, amelyek molekulatömege megközelítőleg $1,0 \times 10^4$ D és megközelítőleg $2,0 \times 10^6$ D között van, a cél olyan N,O-szulfatált heparozánok előállítása, amelyek a jelen találmány tárgyát képezik. A megközelítőleg $4,0 \times 10^6$ D molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánokat olyan kiinduló anyagokból kapjuk, amelyek molekulatömege megközelítőleg $2,0 \times 10^6$ D. A kiinduló anyagok és az N,O-szulfatált heparozánok közötti molekulatömegkülönbség az N,O-szulfatálás következménye.

Részletesebben, a jelen találmány egy további tárgya eljárás olyan termék előállítására, amely 70%-tól 100-ig ter-

jedő mennyiségben jelen találmány szerinti nagy molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánt tartalmaz. Ez az eljárás az alábbi lépésekből áll:

- az a) lépésben: *Escherichia coli* (K5) törzs tenyésztésével nagy molekulatömegű N-acetil-heparozánt (K5 poliszacharidot) termelünk;
- a b) lépésben: az így képződött N-acetil-heparozánt elkülönítjük és tisztítjuk, olyan termék előállítására, mely 70-100%, $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti molekulatömegű láncok keverékéből álló N-acetil-heparozánt tartalmaz, s amely láncokra a (II) képletű, ismétlődő diszacharid-egység jellemző;
- a c) lépésben: az így kapott N-acetil-heparozán terméket dezacetilezzük, s így 70-100% olyan heparozánt tartalmazó terméket kapunk, amely $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti molekulatömegű láncok keverékéből áll, amely láncokra a (III) általános képletű ismétlődő diszacharid-egység jellemző - ahol a (III) képletben R' a diszacharid-egységek 0-80%-ában acetilcsoportot, míg a fennmaradó diszacharid-egységekben hidrogénatomot jelent;
- a d) lépésben teljes vagy részleges N-szulfatálást hajtunk végre, s így 70-100% olyan N-szulfatált heparozánt kapunk, amely $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti

molekulatömegű láncok keverékéből áll, s amely láncokra a (IV) általános képletű, ismétlődő diszacharid-egység jellemző - ahol a (IV) képletben E a diszacharid-egységek 0-80%-ában acetilcsoportot, míg a fennmaradó diszacharid-egységekben szulfátcsoportot vagy adott esetben hidrogénatomot jelent;

majd a fenti parciális vagy teljes N-szulfatálási lépés után parciális vagy teljes O-szulfatálási lépést hajtunk végre;

vagy a kapott heparozánterméket parciális N,O-szulfatálási reakcióba visszük, vagy a kapott heparozánterméket parciális N,O-szulfatálásnak, és ezt követően teljes N-szulfatálásnak vetjük alá, és

a fenti a), b), c) és d) lépések befejezése után adott esetben egy vagy több lépésben a molekulatömegeket frakcionáljuk.

Kiinduló anyagként valamilyen N-dezacetilezett, N-szulfatált K5 poliszacharidot, például az M. Kusche és munkatársai által leírt anyagot [Biochem. J. 275, 151-158 (1991)] használhatjuk.

Egy másik előnyös kiinduló anyag a O 333 243 számú publikált európai szabadalmi bejelentésben közölt K5 poliszacharid.

Különösen előnyös kiinduló anyag egy olyan K5 poliszacharid, amely az Escherichia coli SEBR 3282 tenyésztésével

kapható. Ez a törzs a Bi 8337-41 (O10:K5:H4) ATCC 23506 törzsből származik [részletesen ismertetik D. S. Gupta és munkatársai a következő helyen: FEMS Microbiology Letters 14, 75-78 (1982), valamint W. Vann: Eur. J. Biochem. 116, 359-364 (1981)].

Az *Escherichia coli* SEBR 3282 törzs pozitívan reagál a K5-specifikus fággal végzett tipizálási próbában [a módszer leírását lásd: Kaiser és munkatársai: J. Clin. Microbiol. 19, 264-266 (1984)]. Ennek alapján bizonyosan egy *Escherichia coli* (K5) törzs. E törzset a Pasteur Intézetnél (Párizs, Franciaország) a CNCM I-1013 lajtstromszámmal le-tétbe helyeztük. Alkalmazhatjuk azonban e törzs valamilyen - akár spontán, akár indukált - mutánsát, vagy más alkalmas *Escherichia coli* (K5) törzset, például a Bi 626-42 (O12:K5(L):NM) ATCC 23508 törzset is.

A találmány szerinti termékek kémiai félszintézisében kiinduló anyagként alkalmazott, nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán előállításakor glükóz helyett előnyösebben glicerinben dús tenyésztőközeget alkalmazunk.

Az *Escherichia coli* (K5) törzs tenyésztését a biomassza szaporodásának megszűnése után (megközelítőleg 25-35 órás tenyésztés után a fermentorban) előnyösen legalább 2 órán át folytatjuk.

A b) lépésben az N-acetil-heparozán izolálását és tisztítását olyan eljárással végezzük, amely legalább egy kicsapási lépésből és egy ioncserélő kromatográfiás lépésből áll, hogy 70-100% olyan N-acetil-heparozánt tartalmazó terméket

kapjunk, amely $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti molekulatömegű láncok keveréke, s amely láncokra a (II) képletű, ismétlődő diszacharid-egység jellemző. Az ioncserélő kromatográfiás lépést előnyösen Q-Sepharose oszloppal vagy azzal egyenértékű oszloppal végezzük. A kicsapást megfelelő szerves oldószerrel, különösen valamilyen alkohollal, előnyösen etanollal hajtjuk végre. A tisztítási eljárás során az N-acetil-heparozán valamilyen sója, előnyösen nátriumsója alakjában is lehet.

Példaként az előnyös elkülönítési és tisztítási eljárás a következőképpen vázolható:

- a₁) lépés: kicsapás etanollal;
- b₁) lépés: dialízis;
- c₁) lépés: kicsapás etanollal, majd dehidratálás és szárítás;
- d₁) lépés: tisztítás anioncserélő kromatográfiával;
- e₁) lépés: a d₁ lépésben kapott eluátum kicsapása etanollal, majd dehidratálás, szárítás és őrlés.

Ami az a₁), b₁) és c₁) lépéseket illeti, kivitelezésük sorrendje kevésbé fontos. Az a₁) és c₁) lépések közül az egyik mellőzhető.

Az e₁) lépésben az etanolos kicsapás nem feltétlenül szükséges. Az N-acetil-heparozán elkülönítése más úton - például a d₁) lépésben kapott eluátum vákuumban történő bepárlásával - is végezhető.

Abból a célból, hogy 70-100% olyan N-acetil-heparozán

terméket kapjunk, amely megközelítőleg $1,5 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti molekulaméretű láncok keverékéből áll, az elkülönítést és tisztítást a következőképpen is végezhetjük:

- a'₁ lépés: dialízis;
- b'₁ lépés: tisztítás savas közegben, és a 3,5-1,8 pH-értékű vizes oldatokban oldhatatlan szennyezések eltávolítása;
- c'₁) lépés: kicsapás etanollal, majd dehidratálás és szárítás;
- d'₁) lépés: alkálikus hidrolízis és dialízis;
- e'₁) lépés: tisztítás anioncserélő kromatográfiával;
- f'₁) lépés: tisztítás méretkizárásos kromatográfiával.

Az utóbbi elkülönítési és tisztítási eljárás szintén előnyös, találmány szerinti eljárást képvisel.

Az alkálikus hidrolízist nátrium-hidroxid-oldattal, 30 °C és 80 °C közötti hőmérsékleten valósítjuk meg.

Az elkülönítési és tisztítási eljárások alkalmazása lehetővé teszi olyan kiinduló anyagok felhasználását, amelyet vagy szuszpenzióként a tenyésztés végén kapunk - amely esetben előzetes szűrés szükséges - vagy olyan anyag felhasználását, amelyet előzőleg előzetes tisztításnak vetettünk alá az alábbi lépésekből álló eljárás szerint:

- a" ₁) lépés: a tenyésztés végén kapott szuszpenzió centrifugálása;
- b" ₁) lépés: a felülúszó érintkeztetése alkálikus oldattal;
- c" ₁) lépés: előszűrés;
- d" ₁) lépés: koncentráálás előre meghatározott küszöbértékű

méretkizáró membránon szűrés útján; és adott esetben

e"1) lépés: dialízis.

Alkálikus oldatként ebben az esetben is nátrium-hidroxid-oldatot használhatunk.

A tenyésztés végén kapott terméket a fentebb leírt módszerrel előnyösen előzetes tisztításnak vetjük alá.

A fentebb leírt eljárással kapott (II) általános képletű N-acetil-heparozánok redukáló és nem redukáló végei, valamint az *Escherichia coli* SEBR 3282 törzs vagy más alkalmas, fentebb meghatározott törzs alkalmazásával kapott (II) képletű N-acetil-heparozánok két vége, azaz redukáló és nem redukáló vége uronsav-egység vagy N-acetil-glükózamin-egység.

A láncok többségében a nem redukáló végződés egy (a) képletű uronsav-egység.

Adott esetben az N-acetil-heparozán termék - amely $1,5 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti molekulatömegű láncok keverékéből áll, és a (II) képletű, ismétlődő diszacharid-egységeket tartalmazza - különböző mértékben, kívánt esetben egészen az adott N-acetil-heparozán elkülönítéséig dúsítható. E dúsítás a molekulatömegek frakcionálására általánosan alkalmazott eljárásokkal, például gélszűrési kromatográfiával vagy ultraszűréssel végezhető [A.A. Horner: *Biochem. J.* 262, 953-958 (1989); G. Pyler és munkatársai: *J. Biol. Chem.* 263, 5197-5201 (1988); valamint U. Lindahl és munkatársai: *J. Biol. Chem.* 259, 12368-12376 (1984)]. Alkalmazhatjuk továbbá az etanolos frakcionálás módszerét is (lásd a O 287 477 szá-

mű publikált európai szabadalmi bejelentést). Ez az utóbbi frakcionáló módszer különösen kiválik a többi számbavehető módszer közül.

A c) lépésben a 70-100% olyan N-acetil-heparozánt tartalmazó termékek parciális dezacetilezését - amelyből 70-100% nagy molekulatömegű heparozánt tartalmazó termékek kaphatók, amely utóbbi $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti molekulaméretű láncok keverékéből áll, s amelyre jellemző a fenti (III) általános képletű, ismétlődő diszacharidegység - dezacetilező szerrel végezzük. E célra alkalmazható dezacetilező szer például a foszfor-pentaszulfid, trietil-oxónium-[tetrafluoro-borát], nátrium-hidroxid és a hidrazin; különösen célszerű a legutóbbi két szer használata. Alkalmazhatunk továbbá erős szervetlen savakat, például sósavat vagy kénsavat is. A reakció időtartama a választott műveleti feltételektől, különösen a hőmérséklettől és a reakcióközegben a dezacetilezőszer koncentrációjától függ.

Az $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti molekulaméretű láncok keverékéből álló heparozán - amelyre a (III) általános képletű ismétlődő diszacharidegység jellemző - dúsítását a heparozántermékben a szokásos, molekulatömegek frakcionálására alkalmas, fentebb említett eljárásokkal (géliszűrési kromatográfiával, ultraszűréssel és vízzel elegyedő szerves oldószerek hozzáadásával elért frakcionálással, különösen etanolos frakcionálással) hajtjuk végre. Ebben az esetben olyan terméket kaphatunk, amely 90-100 tömeg%-ban tartalmaz olyan heparozánt, amely $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti moleku-

latömegű láncok keverékéből áll, és a (III) általános képletű, ismétlődő diszacharid-egységből épül fel.

A d) lépés első változata szerint (parciális vagy teljes N-szulfatálás, amelyet parciális vagy teljes O-szulfatálás követ), az N-szulfatálást ismert módszerekkel végezzük [M. Kusche és munkatársai: Biochem. J. 275, 151-158 (1991)]. Pontosabban, az N-szulfatálást kén-trioxid és valamilyen szerves bázis - például trimetil-amin, trietil-amin vagy piridin - komplexével hajtjuk végre; e folyamatot piridines oldatban klór-szulfonsavval is végezhetjük. Előnyösen kén-trioxid trimetil-aminnal alkotott komplexét alkalmazzuk, és az N-szulfatáló reakciót 20 °C és 80 °C közötti hőmérsékleten, vizes-alkálikus közegben játszadjuk le. Az N-szulfatálási reakció végén a kapott terméket megfelelő mennyiségű etanol hozzáadásával kicsapjuk. Az így kapott csapadékot ultratiszta vízben vesszük fel, ultratiszta vízzel szemben dializáljuk, majd liofilizáljuk, és szárítjuk. E tisztítási eljárást példaként említjük, s ez egyenértékű eljárások kizárását nem jelenti. A tisztítási lépések többször ismételhetők.

Ezt követően - a találmány szerint eljárást követve - az O-szulfatálási lépés előtt az N-szulfatált heparozánt előnyösen valamely szerves bázissal sóvá vagy valamely kvaterner ammóniumsóvá alakítjuk. Az utóbbi só képzéséhez előnyösen (tetrabutil-ammónium)-hidroxidot alkalmazunk.

Az O-szulfatáló reakciót formamidban vagy más, ezzel kémiai szempontból egyenértékű oldószerben például kén-trioxid

valamilyen szerves bázissal - így trimetil-aminnal, trietil-aminnal vagy piridinnel - alkotott komplexének alkalmazásával, vagy piridin jelenlétében klór-szulfonsavval végezzük. Előnyösen kén-trioxid és piridin komplexét használjuk. Az O-szulfatáló reakciót általában 10 °C és 50 °C közötti hőmérsékleten valósítjuk meg.

Ezután az N,O-szulfatált heparozánt nátrium-kloridnak a reakcióközeghez adásával csapjuk ki; a nátrium-kloridot addig adagoljuk, amíg koncentrációja az oldatban a 0,3 M - 0,5 M értéket el nem éri; majd az oldathoz megfelelő mennyiségű etanolt adunk. Az N,O-szulfatált heparozántermék tisztítását a következőképpen végezzük: a csapadékot 0,3-0,5 M koncentrációjú nátrium-klorid-oldatban felvesszük, etanollal ismét kicsapjuk, a kivált csapadékot elkülönítjük, ultratiszta vízben felvesszük, ultratiszta vízzel szemben dializáljuk, majd adott esetben liofilizáljuk és szárítjuk.

A fentebb leírt tisztítási eljárást példaképpen közöljük, s ez más, egyenértékű eljárások kizárását nem jelenti. A tisztítási eljárás egyszer vagy többször hajtható végre.

Az N,O-szulfatált heparozántermékben a kívánt molekulatömegű N,O-szulfatált heparozán dúsítását a fentebb már említett, szokásos, molekulatömegek frakcionálására alkalmas eljárásokkal végezzük. Előnyösen úgy járunk el, hogy elvégezzük a dúsítási folyamatot.

Az eljárás d) lépésének (a heparozántermék parciális N,O-szulfatálása vagy parciális N,O-szulfatálás, amely után teljes N-szulfatálási lépés következik) második és harmadik

változata szerint a parciális N,O-szulfatáló lépés előtt a heparozánokat valamilyen szerves bázissal sóvá vagy valamilyen kvaterner ammóniumsóvá alakíthatjuk. A heparozánok kvaterner ammóniumsójának a képzésére előnyösen (tetrabutilammónium)-hidroxidot használunk.

A parciális N,O-szulfatálási lépést - amelyet a 2 584 728 számú francia szabadalmi leírásban (1987. november 10; megfelel a 85.10787 számú francia szabadalmi bejelentésnek) közölt eljárással végzünk - poláris aprotikus oldószerben, például dimetil-formamidban, dimetil-szulfoxidban, hexametil-foszforamidban, acetonitrilben vagy ezeknek az oldószereknek valamely keverékében, például kén-trioxid és valamilyen szerves bázis - így trimetil-amin, trietil-amin vagy piridin - komplexének alkalmazásával valósítjuk meg. E reakció piridines oldatban klór-szulfonsav használatával is megvalósítható. Előnyösen kén-trioxid piridinnel alkotott komplexét használjuk.

Alkalmazhatunk azonban más szulfatáló szereket is: különösen olyan szulfatáló anyagokat, amelyeket E. E. Gilbert ír le [Chemical Review 62, 549-589 (1962)]. Az N,O-szulfatáló reakciót általában 0 °C és 100 °C, előnyösen 10 °C és 50 °C közötti hőmérsékleten 6-14 órás időtartammal valósítjuk meg.

Az előállítási folyamat során, a parciális N,O-szulfatáló reakció végén a 70-100% találmány szerinti N,O-szulfatált heparozánt tartalmazó N,O-szulfatált heparozánterméket nátrium-klorid hozzáadásával csapjuk ki; a nátrium-kloridot addig adagoljuk az elegyhez, amíg koncentrációja az oldatban a

0,3 M - 0,5 M értéket el nem éri, majd megfelelő mennyiségű etanolt adunk az oldathoz. A levált csapadékot 0,3-0,5 M koncentrációjú nátrium-klorid-oldatban vesszük fel, ezt az oldatot közömbösítjük, és megfelelő mennyiségű etanolt adunk hozzá. Az így kapott csapadékot elkülönítjük, ultratiszta vízben felvesszük, ultratiszta vízzel szemben dializáljuk, liofilizáljuk, és szárítjuk.

Az N,O-szulfatáló lépést és ugyanúgy az előbbieken leírt tisztítási lépéseket egyszer vagy többször ismételhetjük. A tisztítási eljárást itt is példaként adjuk meg, és ez egyenértékű eljárások kizárását nem jelenti.

Ezt az N,O-szulfatáló lépést előnyösen egy teljes N-szulfatálást eredményező lépés követi, amelyet általában vizes oldószerben, előnyösen lúgos pH-érték mellett valamilyen szulfatáló szerrel, például kén-trioxid és valamilyen szerves bázis - így trimetil-amin - komplexével a fentebb már leírt N-szulfatáló eljárás szerint hajtunk végre.

A teljes N-szulfatálási lépés végén az N,O-szulfatált heparozánterméket nátrium-klorid hozzáadásával kicsapjuk; ez utóbbit 0,3-0,5 M nátrium-klorid koncentráció eléréséig adagoljuk. Ezután az elegyhez etanolt adunk, a kivált csapadékot 0,3-0,5 N koncentrációjú nátrium-klorid-oldatban ismét oldjuk, etanollal ismét kicsapjuk, a csapadékot ultratiszta vízben felvesszük, ultratiszta vízzel szemben dializáljuk, liofilizáljuk, végül szárítjuk.

Amint már fentebb említettük, előnyösen úgy járunk el, hogy az N,O-szulfatált heparozántermékben az N,O-szulfatált

heparozánt dúsítjuk. Ezt a molekulatömegek frakcionálására általánosan alkalmazott eljárásokkal valósíthatjuk meg.

A találmány tárgyát képező N,O-szulfatált heparozánokat, valamint a legalább 70% új találmány szerinti, N,O-szulfatált heparozánt tartalmazó N,O-szulfatált heparozán-termékeket előnyösen úgy nyerjük, hogy vagy egy végső N-szulfatáló reakciót magában foglaló eljárással, vagy olyan eljárással dolgozunk, amelynek során előbb egy N-szulfatáló reakciót végzünk, és ezt követi egy parciális vagy teljes O-szulfatálás. Ekkor az (I) általános képletű ismétlődő egységekben az E jelentése acetilcsoport és szulfátcsoport.

Méréseink szerint a jelen találmány szerinti N,O-szulfatált heparozánok $0,2 \mu\text{mol/mg}$ -nél kisebb mennyiségű szabad NH_2 csoportot tartalmaznak.

A diszacharid-egységekben az acetilcsoport előnyösen legfeljebb 60%-os szinten van jelen; méréseink szerint a szulfatálás foka - a szulfát/karboxil arányban (hányadosban) kifejezve - 1,5 és 3,0 közötti érték.

A találmány szerinti előnyös termékek olyan N,O-szulfatált heparozánok, amelyek legalább 70 tömeg% $1,0 \times 10^5$ és $5,0 \times 10^5$ D közötti molekulatömegű láncokból állnak; valamint olyan N,O-szulfatált heparozánok, amelyek legalább 70 tömeg% $2,0 \times 10^4$ és $2,5 \times 10^5$ D közötti molekulatömegű láncokat tartalmaznak.

Más előnyös, találmány szerinti termékeként említhetjük azokat az N,O-szulfatált heparozánokat, amelyek legalább 70 tömeg%-ban $2,0 \times 10^4$ és 10^5 D közötti molekulatömegű lán-

cokból állnak.

Az N,O-szulfatált heparozánok előállítására fentebb ismertetett eljárás, valamint a tisztítási módszerek lehetővé teszik az N,O-szulfatált heparozánok kinyerését nátriumsók alakjában. Ezekből a sókból - a heparin különböző sóinak vagy a sóvá nem alakított heparinnak az előállítására használt módszerek útján ["A heparin: gyártása, szerkezete, tulajdonságai, elemzése" (franciául), szerzője J. P. Duclos, kiadó: Masson, 81-83 Franciaország, 1984)] mind az N,O-szulfatált heparozánok más sóit, mind a sóvá nem alakított N,O-szulfatált heparozánok előállíthatók. Az N,O-szulfatált heparozán sóin az összes, gyógyászati szempontból elfogadható sókat értjük. Ezek a sók a szokásos módszerekkel - kiváltképpen a heparinsók előállítására leírt módszerekkel (lásd a 4 168 377 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást) - előállíthatók.

A találmány szerinti N,O-szulfatált heparozánok előnyös farmakológiai és biológiai sajátosságokkal rendelkeznek, amelyek együttese a technika jelenlegi állása szerint közölt kitanításokhoz viszonyítva meglepő. Közelebbről, ellentétben a 0 333 243 számú publikált európai szabadalmi bejelentésben leírt szulfatált K5 antigén termékekkel - amelyek érképződés elleni és daganatgátló hatással, sőt burkolatos vírusok elleni hatással rendelkeznek, és e hatásaik kedvező arányban vannak a véralvadásgátló sajátágaikkal - a jelen találmány szerinti N,O-szulfatált heparozánok kedvező szabályzó hatást fejtenek ki a véralvadásra. E hatásuk sokkal erősebb, mint a

dermatán-szulfát hatása a véralvadás különböző paramétereire, e hatásuk inkább a heparinéval hasonlítható össze.

A jelen találmány szerinti reprezentatív termékek ATIII-vagy HCII-függő, trombin IIa elleni hatékonyságát Dupouy és munkatársai [Thrombosis and Haemostasis 60, 236-239 (1988)] II heparin-kofaktorra leírt módszerével, valamint M. L. Larsen és munkatársai [Thrombosis Research 13, 285-288 (1978)] antitrombinra (ATIII) leírt módszerének alkalmazásával határoztuk meg.

A vizsgálat mindkét esetben úgy történt, hogy mértük a vizsgált termék gátló hatását tisztított trombinra (IIa faktorra) tisztított HCII vagy ATIII jelenlétében, és meghatároztuk a trombin amidolitikus hatását kromogén szubsztrátum alkalmazásával. Összehasonlító (referens) anyagként e tesztben dermatán-szulfátot alkalmaztunk, amely a legerősebb HCII-függő IIa elleni hatással rendelkezik; a dermatán-szulfátot H. W. Stuhlsatz és munkatársai eljárásával állítottuk elő ["A kötőszövetkutatás módszertana" (angolul) 137-146 (1976)], és az eredményeket a dermatán-szulfát (rövidítve: DS) azon milligrammban megadott mennyiségében fejeztük ki, amelynek aktivitása 1 mg vizsgált termék hatásával egyenértékű (mg DS ekvivalens/mg).

A találmány szerinti reprezentatív termékek Xa elleni hatását (Yin-Wessler titerét) az E. T. Yin és munkatársai által leírt módszerrel [J. Lab. Clin. Med. 81, 298-310 (1973)] mértük; míg teljes antikoaguláns hatásukat az R. R. Proctor és munkatársai által leírt APTT-teszttel határoztuk

meg [Am. J. Clin. Path. 36, 212-219 (1961)]. Valamennyi vizsgált termék HCII-függő, IIa elleni (az alábbiakban esetenként: anti-IIa) hatást mutatott, amely kifejezetten erősebb volt, mint a dermatán-szulfát hatása. Jóllehet az ATIII-függő IIa elleni hatás és a Yin-Wessler titer gyengébb volt, mint a heparinoké, mégis erősebbnek bizonyult, mint a dermatán-szulfát esetében. A találmány szerinti termékek APTT titere megközelítőleg 2-15-ször nagyobbak, mint a dermatán-szulfát megfelelő értékei, és elérhetik a heparin hatásának 40%-át.

Mindezek alapján a találmány szerinti N,O-szulfatáz heparozánok különösen kedvező, specifikus hatással és anti-koaguláns aktivitással rendelkeznek.

A találmány szerinti N,O-szulfatált heparozánok toxicitása igen csekély; toxicitásuk teljes mértékben összeegyeztethető gyógyszerként való alkalmazásukkal.

Ennek alapján a találmány azokra a gyógyászati készítményekre is kiterjed, amelyek hatóanyagként egy találmány tárgyát képező N,O-szulfatált heparozánt vagy annak valamely sóját tartalmazzák; vagy hatóanyagként legalább 70% ilyen N,O-szulfatált heparozánt - vagy annak valamilyen sóját - tartalmazó N,O-szulfatált heparozánterméket egy vagy több, gyógyászati szempontból elfogadható hígítószerrel, vivő- és/vagy segédanyagokkal összekeverve tartalmazznak.

E gyógyászati készítmények főként az érfal megbetegedéseinek, például az ateroszklerózis, arterioszklerózis, valamint a vér túlzott alvadékonyságával járó állapotok (hiper-

koagulabilitási állapotok) - például műtétek utáni, súlyosbodó daganatok, vagy enzimatis, baktériális vagy virális aktiváló anyagok által kiváltott kóros állapotok - megelőző vagy gyógyító kezelésére alkalmazhatók.

Az adag a kortól, a beteg testsúlyától és egészségi állapotától, valamint a betegség természetétől és súlyosságától és az adagolás módjától függően széleskörűen változtatható. Az adagolás során megközelítőleg 1 mg-1 g mennyiségű hatóanyagot, előnyösen megközelítőleg 5 mg-500 mg napi adagot, például 200 mg napi adagot alkalmazunk egy vagy több dózisban, intravénásan vagy szubkután úton, szakaszosan, szabályszerű időközökben; vagy 200-1000 mg hatóanyagot adagolunk naponta orális úton.

A fenti adagokat természetesen minden egyes beteg esetében a megfigyelt eredmények és az előzőleg elvégzett vérelemzés eredményei szerint állíthatjuk be.

A találmány szerinti eljárás b), c), illetve d) lépéseiből származó N-acetil-heparozánok [(II) képletű vegyületek], heparozánok [(III) általános képletű vegyületek] és N-szulfatált heparozánok [(IV) általános képletű vegyületek], továbbá a találmány tárgyát képező N,O-szulfatált heparozánok, valamint mindezen anyagok hasítási termékei nagy molekulatömegű közbenső termékeként felhasználhatók kis molekulatömegű N-acetil-heparozánok, heparozánok, N-szulfatált heparozánok és N,O-szulfatált heparozánok - amelyek molekulatömege $1,5 \times 10^4$ D-nál kisebb, és különösen $1,5 \times 10^3$ és $1,5 \times 10^4$ D közötti érték - előállítására depolimerizáció út-

ján.

Ez a depolimerizáció az irodalomban az alacsony molekulatömegű heparinok előállítására leírt módszerekkel végezhető: például perjodátos depolimerizáció útján, különösen a 0 287 477 számú publikált európai szabadalmi bejelentésben közölt módszerrel, vagy szabadgyökös depolimerizáció útján, és különösen a 121 067 számú európai szabadalmi leírásban ismertetett módszerrel.

A depolimerizáció végrehajtható továbbá β -eliminációs reakcióval is, közelebbről a 0 040 144 számú publikált európai szabadalmi bejelentésben leírt eljárással. Ez utóbbi esetben egy adott esetben O-szulfatált, a nem redukáló végén α, β -telítetlen, (a) általános képletű végcsoportot tartalmazó terméket kapunk.

A depolimerizációt előnyösen végezhetjük salétromossavval, különösen a 0 037 319 számú európai szabadalmi leírásban ismertetett módon. Ez a módszer első lépésében olyan termékeket eredményez, amelyek redukáló végződésükön egy (b) általános képletű 2,5-anhidromannóz-egységet tartalmaznak, ahol G jelentése hidrogénatom vagy hidrogénatom és szulfátcsoport, a depolimerizációs reakcióba vitt anyagoknak megfelelően [G jelentése hidrogénatom a (III) és (IV) általános képletű vegyületek esetében, míg G hidrogénatomot és szulfátcsoportot jelent az (I) általános képletű vegyületek esetén]; ezt követően - ha a depolimerizációt redukációs reakció követi - olyan hasítási termékeket kapunk, amelyek redukáló végződésükön egy (c) általános képletű 2,5-anhidro-

mannit-egységet tartalmaznak, ahol G' jelentése hidrogén-atom, ha a depolimerizációs reakciót szulfatálás nem követi, míg G' szulfátcsoporthoz jelent akkor, ha a depolimerizációs reakció után szulfatálást hajtunk végre.

Ha a salétromossavval végzett depolimerizáció után oxidációs reakciót végzünk, akkor olyan hasítási termékeket kapunk, amelyek redukáló végződésükön egy (d) általános képletű 2,5-anhidromannonsav-egységet tartalmaznak.

Adott esetben a depolimerizáció enzimikus módszerrel is végezhető, például a 0 244 235 és 0 244 236 számú publikált európai szabadalmi bejelentésekben közölt módon.

A fentebb említett depolimerizációs módszereket példaként adjuk meg, s ezek nem korlátozó jellegűek. Bármely, a glikóزامino-glikánok depolimerizációjára alkalmas más módszer is használhatunk. Ezt követően a depolimerizációs reakcióban kapott termékeket a kis molekulatömegű láncokból álló N-acetil-heparozánok, heparozánok, N-szulfatált heparozánok és N,O-szulfatált heparozánok előállítására céljából egy vagy több frakcionáló műveletnek vethetjük alá.

A fentiek alapján a jelen találmány egy további tárgya nagy molekulatömegű N-acetil-heparozánok [(II) képletű vegyületek], heparozánok [(III) általános képletű vegyületek], valamint a találmány szerinti, nagy molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánok [(I) általános képletű vegyületek] felhasználása $1,5 \times 10^4$ D-nál kisebb molekulatömegű N-acetil-heparozánok, heparozánok, N-szulfatált heparozánok és N,O-szulfatált heparozánok előállítására depolimerizáció útján.

A jelen találmány egy másik, még különösebb tárgya az N-szulfatált heparozánok [(IV) általános képletű vegyületek] és N,O-szulfatált heparozánok [(I) általános képletű vegyületek] alkalmazása $1,5 \times 10^4$ D-nál alacsonyabb, különösen $1,5 \times 10^3$ D és $1,5 \times 10^4$ D közötti méretű, kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánok előállítására hasítási reakció útján.

Ha a hasítási reakció céljára kiinduló anyagként (IV) általános képletű vegyületeket alkalmazunk, akkor kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánokat kapunk olyan módon, hogy a (IV) általános képletű termékek hasítása útján előállított, kis molekulatömegű N-szulfatált heparozánokat parciális N,O-szulfatálásnak vagy - teljes N-szulfatáló lépés után - parciális N,O-szulfatálási reakciónak vetjük alá.

A találmányt az alábbi nem korlátozó jellegű példákban részletesen ismertetjük.

I. termék előállítása

Nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán előállítása

(I. eljárás)

- 1) *Escherichia coli* (K5) baktériumtörzs tenyésztése,
és az N-acetil-heparozánt tartalmazó szűrlet elkülönítése

Escherichia coli SEBR 3282 törzset [letétbe helyezve a Pasteur Intézetben (Párizs, Franciaország) CNCM I-1013 lajstromszámmal] 400 ml B közegben (pontos összetételét lásd

az I. táblázatban) tenyésztünk úgy, hogy az elegyet keverés közben 2 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk.

Az így kapott előtenyészetet 18,5 literes fermentorba visszük át, amely 11 liter A közeget tartalmaz (pontos összetételét lásd az I. táblázatban), és az elegyet 6,5 órán át 37 °C hőmérsékleten 7,2 pH-érték megtartásával inkubáljuk; eközben az oxigén parciális nyomását 5,3 kPa értéken tartjuk levegő befúvatásával (20 liter/min mennyiségileg), keverés közben. Ezután glicerint adunk hozzá úgy, hogy folyamatosan 500 g/liter glicerint tartalmazó steril oldatot vezetünk be 16-17 órán át 18 g/óra sebességgel.

A tenyésztést azonos hőmérsékleten, azonos pH- és parciális oxigénnyomás megtartásával addig folytatjuk, amíg lényegében a glicerin teljes mennyisége el nem fog. A szuszpenziós tenyésztőközeg DD-értékének (optikai sűrűségének) monitorozása a glicerin adagolásának befejezése után [DO értéke $\lambda = 600$ nm-en] azt mutatja, hogy ha a fermentorban a tenyésztést 28-30 óra eltelte után leállítjuk, akkor stacionárius állapot vagy enyhe lízis következik be.

Ezt követően a fermentlevet (tenyésztőelegyet) 25 °C-ra hűtjük, és 0,22 μ m porozitású (szűrőnyílású) membránon szűrjük. Így megközelítőleg 12 liter, N-acetil-heparozánt tartalmazó szűrletet kapunk.

I. táblázat

Az A és B közeg összetétele és előállítása

A közeg

900 ml ultratiszta vízben az alábbi sorrendben az alábbi komponenseket oldjuk:

Nitrilo-triecsav (röviden: NTA)	1000 mg
K ₂ HPO ₄	790 mg
Glutaminsav	11 000 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	500 mg
K ₂ SO ₄	450 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	18 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2 mg
NaCl	500 mg
KCl	5000 mg

Nyomelemeket tartalmazó oldat (lásd a

II. táblázatot)

1 ml

Glicerín

10 000 mg

A pH értékét tömény, 1,38 sűrűségű kálium-hidroxid-oldattal 7,2-re állítjuk, majd az oldatot ultratiszta vízzel 1000 ml-re töltjük. Ezután az oldatot 0,2 µm pórusméretű membránon sterilizáló szűrésnek vetjük alá.

A glicerínoldat készítése

50 g glicerint elegendő mennyiségű ultratiszta vízben oldunk, és ultratiszta vízzel az oldat térfogatát 1000 ml-re

egészítjük ki, majd az oldatot $0,2\ \mu\text{m}$ pórusméretű membránon sterilizáló szűrésnek vetjük alá.

A fermentáció alatt habzásgátló szerként Struktol^{RJ} 673 (Schill és Seilacher) készítményt alkalmazunk.

B közeg

A B közeget ugyanúgy állítjuk elő, mint az A közeget, azzal az eltéréssel, hogy ajánlatos puffer (pH 7,2) hozzáadása a habzásgátló szer hozzáadása után. Pufferanyagként 3-morfolino-propánszulfonsavat (rövidítve: M.O.P.S.) alkalmazunk.

II. táblázat

**Az A közeg és B közeg előállítása során alkalmazott
nyomelemoldat előállítása**

800 ml ultratiszta vízben az alábbi sorrendben az alábbi komponenseket oldjuk:

H_3BO_3	500 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1930 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	11 850 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2000 mg
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2410 mg

Az elegyhez 100 ml 1,19 sűrűségű

sósavat adunk, és ultratiszta vízzel 1000 ml-re
töltjük.

2) Túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán
elkülönítése és tisztítása

a lépés: Kicsapás etanollal:

A szűrlethez megközelítőleg 48 liter 95 térf./térf.%-os etanolt adunk, majd az elegyet kicsapás és ülepedés céljából 4 °C hőmérsékleten 8 órán át állni hagyjuk.

Ekkor a felülúszót leszivatással eltávolítjuk, majd centrifugáljuk, és a centrifugálásból származó pelletet körülbelül 1 liter ultratiszta vízben felvesszük.

b lépés: Dialízis:

Az előző lépésben kapott oldatot cellulóz-alapú membránból álló, 24 Å porozitású Nojax 40 zsákba helyezzük, és ultratiszta vízzel szemben 24 órán át dializáljuk (1 térfogat oldatra vonatkoztatva 6 térfogat vizet veszünk, amelyet 2, 8 és 16 óra elmúltával friss vízzel cserélünk).

E művelet lehetővé teszi a tenyésztőközegben jelenlévő kis molekulájú anyagok, például sók, cukrok, aminosavak, oligonukleotidok és oligopeptidek eltávolítását.

c lépés: Kicsapás, dehidratálás és szárítás:

1 térfogat dializált oldathoz 0,5 M nátrium-kloridot és 4 térfogat etanolt adunk. Az elegyet a csapadék leválása céljából 5 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd az elegyet 5000xg sebességgel 20 percig centrifugáljuk.

A centrifugálásból származó pelleteket etanolban felvesszük, az így kapott szuszpenziót keverés közben szobahőmérsékleten 1 órán át állni hagyjuk. Ekkor a centrifugálást

és a szuszpendálást megismételjük, majd az így kapott elegyet 5000xg sebességgel 20 percig ismét centrifugáljuk. Az így kapott pelleteket kemencében, vákuumban 40 °C hőmérsékleten 24 órán át szárítjuk.

d lépés: Örlés poralakká:

A centrifugálásból származó, száraz pelleteteket vízmentes körülmények között mozsárban porítjuk.

e lépés: Anioncserélő kromatográfia:

A centrifugálásból származó, porított pelleteteket "D" jelű pufferoldatban vesszük fel, amely 100 ml/g mennyiségben 20 mM Tris-HCl-t tartalmaz (pH 7,5).

Az így kapott oldatot erős anionok cseréjére alkalmas oszlopon kromatografáljuk, amely kvaterner ammóniumcsoportokkal térhálósított agaróz matrixot tartalmaz (a Pharmacia cég "gyors áramlású Q-Sepharose" terméke), amelyet előzőleg "D" pufferoldattal egyensúlyoztunk; az anioncserélő gyantát 1 g porra számítva 5 ml gél mennyiségben alkalmazzuk.

A gélt elegendő mennyiségű "D" pufferrel mossuk, hogy az UV-detektálással megfigyelt alapértéke 214 nm-re visszaálljon; ezután 25 mM 3,5 pH-értékre beállított piperazinoldattal mossuk.

Az eluálást 3,5 pH-értékű olyan oldattal végezzük, amelynek összetétele: 0,5 M nátrium-klorid és 25 mM piperazin. Az eluátumot 5 N nátronlúg nátrium-hidroxid-oldattal semlegesítjük.

f lépés: Kicsapás, dehidratálás, szárítás és örlés:

A c és d lépésekben leírt műveleteket ismételjük

nátrium-klorid hozzáadása nélkül.

Az f lépésben kapott N-acetil-heparozánt "A" tételnek (sarzsnak) nevezzük.

3) A különböző tisztítási lépésekből kapott N-acetil-heparozán jellemzése

Magmágneses rezonancia (NMR) színekép

Az ^1H -NMR és ^{13}C -NMR színeképeket a W. F. Vann által leírt N-acetil-heparozán értékeivel [Eur. J. Biochem. 116, 359-364 (1981)] hasonlítottuk össze.

Az "A" sarzsból kapott N-acetil-heparozán színeképi vizsgálata alátámasztja, hogy e termék kémiaailag azonos a W. F. Vann által leírt N-acetil-heparozán termékkel: olyan polimer láncokból áll, amelyek ismétlődő β -D-glükuronil-1,4- α -N-acetil-D-glükózaminil-(1,4)-egységekből tevődnek össze.

A molekulatömeg megoszlásának meghatározása méretkizárásos kromatográfiával

Az első módszer

A molekulatömeg megoszlását méretkizárásos HPLC módszerrel határoztuk meg az alábbi körülmények között:

- * Az oszlop olyan szilikagyöngyökből állt, amelyek átmérője $10\ \mu\text{m}$, porozitása $250\ \text{\AA}$.
- * Eluálószer $0,5\ \text{M}$ vizes nátrium-szulfát-oldat
- * Áramlási sebesség: $1\ \text{ml/perc}$.
- * UV-detektálás $\lambda = 205\ \text{nm}$ hullámhosszon.
- * A kalibrálást heparinból származó, alábbi moleku-

latömegű oligoszacharidok sorozatával végeztük: 1324, 1883, 2436, 3411, 3996, 4535, 4995, 5365, 6150, 6671, 7542, 8655, 10 088, 11 561, 12 950, 14 809, 17 387 és 22 674 D.

Tekintettel a kalibrálási tartományra, csak a 930 D és 57 100 D közötti molekulatömegeket értékeltük ki pontosan. Feltételezhető, hogy a detektált optikai sűrűség arányos az N-acetil-heparozán mennyiségével. A módszer pontossága nagy molekulatömegek, különösen 5×10^4 D feletti molekulatömegek esetében jelentősen csökkent.

Az "A" sarzs méretkizárásos kromatográfiájának eluálási profilja arra a következtetésre vezet, hogy eloszlása polidiszperz, és megoszlásának uralkodó csúcsa megközelítőleg 2×10^5 D-nál van. Az "A" sarzs legalább 70 tömeg%-ot kitevő frakciójának a molekulatömege $1,0 \times 10^5$ és $3,0 \times 10^5$ D közötti tartományban van.

A második módszer

Az eredményeket méretkizárásos HPLC módszerrel, fényszórás-detektorral igazoltuk.

- * Oszlopok: Egy előoszlopból és három ezt követő oszlopból összetett rendszer:
 - PL-Aquagel-OH^R (előoszlop)
 - PL-Aquagel-OH 40^R
 - PL-Aquagel-OH 50^R
 - PL-Aquagel-OH 60^R
- * Eluálószer: 400 ppm nátrium-azidot tartalmazó vizes oldat

* Áramlási sebesség: 1 ml/perc

* Szobahőmérséklet

* Detektálás: differenciál-refraktométer/fényszórás

együttesen. A tömeg-detektor válasza (azaz a fényszórás) a következő szorzattal arányos:

$$C \times (dn/dc)^2 \times M_w$$

ahol C jelenti a koncentrációt;

dn/dc jelenti a törésmutató növekedését
(differenciálhányadosát)

M_w jelenti az átlagos molekulatömeget.

A dn/dc hányados kiszámítását a differenciál-refraktométer válaszaiból végeztük két összehasonlító minta értékének figyelembevételével (70 000 D, illetve 150 000 D átlagos molekulatömegű dextrán).

E módszer megerősítette, hogy az "A" sarzs legalább 70 tömeg%-os frakciójának a molekulatömege $1,0 \times 10^5$ és $3,0 \times 10^5$ D tartományban van, továbbá az "A" sarzs méretkizárásos kromatográfiájával nyert eluálási profil uralkodó csúcsa megközelítőleg 210 000 D értéknél helyezkedik el.

A molekulatömeg megoszlásának megfigyelése (monitorozása) poliakrilamid-gélen végzett elektroforézissel

Az elemzésre szánt mintákat, valamint a vándorlás végét jelző brómfenolkéket tartalmazó jelzőanyagot elektroforézisnek vetettük alá Tris-borát-pufferban 15%-os poliakrilamid-gélen, amelyet úgy kaptunk, hogy akrilamid és N,N'-metilén-

-bisz(akrilamid) 29:1 arányú keverékét polimerizáltuk.

A vándoroltatást 40 mA áramerősség mellett körülbelül 4 órán át 18 cm hosszúságú gélen végeztük, amíg a vándorlás végét jelző anyag a gélről távozott. Ekkor a gél alciankékkel, majd ezüsttel festettük S. Pelkonen és munkatársai eljárása szerint [J. Bact. 170, 2646 (1983)], amely savas poliszacharidokra specifikus.

Ezt az elektroforétikus elemzést mind az a lépésből kapott, részlegesen tisztított terméken, mind a végső lépésből származó, tisztított terméken elvégeztük, azzal a céllal, hogy igazoljuk: a tisztítás során az N-acetil-heparozán molekulatömeg-eloszlásában jelentősebb változások nem léptek fel.

Az a lépésből kapott, részlegesen tisztított termék profiljainak, valamint a végső lépésben tisztított termék profiljainak a megfigyelése megmutatta, hogy jelentősen nem különböznek (azonos vándorlási távolságokban hasonló intenzitású sávok jelentek meg). Mindezek alapján az N-acetil-heparozán molekulatömeg-megoszlásában a tisztítás során nem lép fel jelentős változás.

Az uronsavak kvantitatív meghatározása

A végső lépésben kapott, tisztított termék egységnyi tömegére vonatkoztatott uronsav mennyiségét kolorimetriás úton határoztuk meg T. Bitter módszerével [Analytical Biochemistry 4, 330-334 (1962)]. Ez a kvantitatív meghatározási módszer a glikózamino-glikánok karbazollal forró savas

közegben végbemenő reakcióján alapul, amelynek során fellépő rózsaszínű elszíneződés arányos a felszabadult uronsav mennyiségével. Ebben az adott esetben a sav glükuronsav.

Az "A" sarzs esetében a végső lépésben kapott, részlegesen tisztított termék uronsavtartalma $2,2 \mu\text{mol/mg}$ értéknek adódott.

Spektrofotometria az UV és a látható fény tartományában

Az "A" sarzsból származó, tisztított terméket ultratiszta vízben oldottuk, és az így kapott, 1 mg/ml koncentrációjú oldatot 1 cm optikai hosszúságú edénybe helyeztük. Rögzítettük az oldat abszorpciós spektrumát 200 és 600 nm között.

Az így kapott színek alapján igazolható volt, hogy különösen a 256 nm hullámhosszon megfigyelt elnyelés alapján az "A" sarzs 1% -nál kevesebb DNS-t tartalmazott.

Az összes fehérjetartalom kvantitatív meghatározása

A Biorad^R márkanevű fehérjemeghatározó készletet alkalmaztuk az összes fehérjetartalom meghatározására. A meghatározás alapja abban áll, hogy Coomassie Brilliant Blue g-250 savas oldatában az elnyelési maximum hullámhossza 465 nm -ről 495 nm -re tolódik, ha a fehérjék a színezékekhez kötődnek [Reisner és munkatársai: Anal. Biochem. 64, 509 (1975)].

Az "A" sarzsban a fehérjék összes mennyisége $1,5\%$ -nál kisebb.

A szabad NH_2 -csoportok kvantitatív meghatározása

E kvantitatív meghatározást Zensaku Yosizawa és munkatársai módszerével végeztük [Biochemica et Biophysica Acta 141, 358-365 (1967)].

A szabad NH_2 -csoportok mennyisége ($\mu\text{mol/mg}$ -ban kifejezve) a dezacetilezett β -D-glükuronil-1,4- α -N-acetil-D-glükóz-aminil-(1,4)-egységek, valamint az esetleg jelenlévő, szabad NH_2 -csoportot tartalmazó szennyezések mennyiségének jelző paramétere.

Az "A" sarzs szabad NH_2 -csoportot $0,1 \mu\text{mol/mg}$ mennyiségben tartalmaz.

II. termék előállítása

Túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán előállítása

(II. eljárás)

- 1) Escherichia coli (K5) baktériumtörzs tenyésztése, és az N-acetil-heparozánt tartalmazó szűrlet elkülönítése

Az Escherichia coli SEBR 3282 törzs tenyésztését és az N-acetil-heparozánt tartalmazó szűrlet elkülönítését az I. termék előállítása során leírt módszerrel végeztük.

- 2) A túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán elkülönítése és tisztítása

a) lépés: Dialízis:

375 ml szűrletet az I. termék előállítására leírt eljárással dializálunk [I. termék előállítása, 2) lépés: Túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán elkülöní-

tése és tisztítása, b lépés]. Dialízis után körülbelül 1020 ml tisztított oldatot kapunk.

b) lépés: Tisztítás savas közegben:

A dializált oldathoz 3,5-ös pH eléréséhez elegendő mennyiségű 5 N sósavoldatot adunk. A kivált csapadékot centrifugálással eltávolítjuk, majd az oldatot 5 N sósavval 1,8 pH-értékre savanyítjuk. Esetleg csapadék képződhet, amelyet centrifugálással eltávolítunk, majd az oldatot 5 N nátronlúgoldattal közömbösítjük.

c) lépés: Kicsapás, dehidratálás és szárítás:

A közömbösített oldathoz addig adagolunk nátrium-kloridot, amíg annak koncentrációja a 0,5 M értéket el nem éri, majd 4-szeres térfogatú etanolt adunk hozzá. Az elegyet szobahőmérsékleten tartjuk 5 percig a csapadék teljes leválása céljából, majd az elegyet 5000xg sebességgel 20 percig centrifugáljuk.

A centrifugálásból származó pelleteteket etanolban felvesszük, és az így kapott szuszpenziót 1 órán át szobahőmérsékleten keverjük. Ezután a centrifugálás és a szuszpendálás műveletét megismételjük. Az így kapott elegyet 5000xg sebességgel 20 percig ismét centrifugáljuk.

A centrifugálásból eredő pelleteteket vákuumkamrában 40 °C hőmérsékleten 24 órán át szárítjuk.

d) lépés: Alkálikus hidrolízis és dialízis:

Az előző lépésben kapott terméket szárítás után 2,5 tömeg/térf. %-os koncentrációban 0,25 N nátronlúgoldatban oldjuk, és az így kapott oldatot 2 órán át 50 °C hőmérsékleten

tartjuk.

Ekkor az oldatot 5 N sósavoldattal közömbösítjük, majd a poliszacharidot tartalmazó oldatot az I. termék előállítására leírt eljárással dializáljuk [I. termék előállítása, 2) lépés: Túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán elkülönítése és tisztítása, b lépés].

Dialízis után körülbelül 990 ml oldatot kapunk.

e) lépés: Anioncserélő kromatográfia:

A dializált oldathoz olyan mennyiségben adunk piperazint, EDTA-t és Triton X-100 (Prolabo^R) készítményt, hogy az oldatban a piperazin koncentrációja 25 mM, az EDTA koncentrációja 2 mM és a Triton X-100 koncentrációja 0,2 térf./térf.% legyen.

Ezt követően a pH-t 5 N sósavoldattal 3,5-re állítjuk, és az oldatot 400 ml Q-Sepharose gyors áramlású oszlopra visszük, amelyet előzőleg a 25 mM piperazint, 2 mM EDTA-t és 0,2 mM Triton X-100-at tartalmazó piperazin-pufferoldattal (pH = 3,5) egyensúlyba hoztuk.

Az oszlopot a piperazin-pufferoldattal mossuk, utána 0,5 M nátrium-klorid-oldattal eluáljuk, majd a terméket 4-szeres térfogatú etanollal kicsapjuk.

Az így kapott terméket vákuumban 40 °C hőmérsékleten szárítjuk. Így megközelítőleg 9,85 g N-acetil-heparozánt kapunk.

f) lépés: Méretkizárásos kromatográfia:

4 g előző lépésben kapott terméket 60 ml olyan pufferoldatban oldunk, amelynek összetétele: 20 mM Tris-HCl

(pH 7,5) és 1 M nátrium-klorid. Az így kapott oldatot előzőleg azonos összetételű pufferoldattal kiegyensúlyozott, 200 ml oktil-Sepharose^R oszlopon vezetjük át.

Az oszlop által vissza nem tartott frakcióhoz 4-szeres térfogatú etanolt adunk, a kivált csapadékot mossuk, és 40 °C hőmérsékleten vákuumban szárítjuk.

Így 3,90 g N-acetil-heparozánt kapunk ("B" sarzs).

3) A különböző tisztítási lépésekben kapott N-acetil-heparozán jellemzése

Magmáneses rezonancia (NMR) színekép

Az ¹H-NMR és ¹³C-NMR színeképek vizsgálata igazolta, hogy a kapott N-acetil-heparozán kémiaailag azonos a W. F. Vann által leírt N-acetil-heparozánnal [Eur. J. Biochem. 116, 359-364 (1981)].

A molekulatömeg-megoszlás meghatározása méretkizárásos kromatográfiával:

A molekulatömeg-megoszlást méretkizárásos HPLC módszerrel határoztuk meg az I. termék előállításánál leírt N-acetil-heparozánok molekulatömeg-megoszlásának meghatározására alkalmazott módszerrel. Azt találtuk, hogy a "B" sarzs legalább 60 tömeg%-ot kitevő frakciójának a molekulatömege $5,0 \times 10^4$ és $2,5 \times 10^5$ D közötti tartományban van.

Az uronsavak kvantitatív meghatározása

Az e lépésből származó N-acetil-heparozán uronsavszintje 2,2 µmol/mg-nek adódott.

Spektrofotometria az UV és látható fény tartományában

A színekép alapján beigazolódott, hogy az így kapott N-acetil-heparozán 1%-nál kisebb mennyiségű DNS-t tartalmaz.

Az összes fehérjetartalom kvantitatív meghatározása

A "B" sarzsban az összes fehérjemennyiséget 1%-nál kevesebbnek találtuk.

A szabad NH₂-csoportok kvantitatív meghatározása

A "B" sarzsban az NH₂-szint 0,1 μ mol/mg-nél kevesebbnek adódott.

III. termék előállítása

Túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán előállítása

(III. eljárás)

1) Escherichia coli (K5) baktériumtörzs tenyésztése

Az Escherichia coli SEBR 3282 törzs tenyésztését az I. termék előállításában leírt módszerrel végeztük. Körülbelül 12 liter, N-acetil-heparozánt tartalmazó fermentlevet kaptunk.

2) Előzetes tisztítás:

a) lépés: Centrifugálás:

A centrifugálás végén a kapott szuszpenziót percenként 8000 fordulatszámmal (vagy 11 000 x g és 14 000 x g közötti sebességgel) 20 percig centrifugáljuk.

b) lépés: Érintkeztetés alkálikus oldattal

Centrifugálás után a pelletet eltávolítjuk, és a felülúszót körülbelül 1 órán át 0,1 N nátronlúgoldattal hozzuk érintkezésbe.

c) lépés: Előszűrés:

Az előző lépésben kapott oldatot előszűrésnek vetjük alá egy polipropilénből készült 3M^R sorozatú 300 szűrőn.

d) lépés: Koncentrálás előre meghatározott mérethatár-kizárású membránon

A c) lépésben kapott szűrletet Amicon^R üreges rostokból álló lapon szűrjük, amelynek molekulaméret-kizárási határértéke 30 000 D vagy ezzel egyenértékű. Így olyan oldatot kapunk, amely nagy molekulatömegű N-acetil-heparozánt koncentráltan tartalmaz.

e) lépés: Dialízis:

A nagy molekulatömegű N-acetil-heparozánt koncentráltan tartalmazó oldatot ultratiszta vízzel szemben - még az Amicon^R rendszerben - igen nagy (10 000-nél nagyobb) hígítási faktorial dializáljuk.

3) A túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán elkülönítése és tisztítása

Az elkülönítést és tisztítást vagy az I. termékre leírt módon végezzük [2) Túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán elkülönítése és tisztítása, c - f lépések], s így olyan, "C" sarzsak jelölt N-acetil-heparozánt kapunk, amelynek jellemzői hasonlóak az "A" sarzs jellemzőihez; vagy

úgy végezzük, mint azt a II. termék esetére bemutattuk

[2) Túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán elkülönítése és tisztítása, a - f lépések].

IV. termék előállítása

Túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán előállítása

(IV. eljárás)

1) Escherichia coli (K5) baktériumtörzs tenyésztése

Az Escherichia coli SEBR 3282 törzs tenyésztését a I. termékre leírt eljárással végezzük, tenyésztőközegként azonban az A közeg helyett C közeget, és a B közeg helyett D közeget használunk.

A C és D közegek összetételét az alábbiakban közölt táblázatban adjuk meg.

Ilyen módon mintegy 12 liter, N-acetil-heparozánt tartalmazó szűrletet kapunk.

2) Túlnyomó részben nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán elkülönítése és tisztítása

Az izolálást és tisztítást az I. termék előállítására [2) Túlnyomórészt nagy molekulatömegű N-acetil-heparozán izolálása és tisztítása, a) - f) lépés] leírt eljárással végezzük, s így a "D" sarzshoz jutunk.

3) A fentiek szerint kapott N-acetil-heparozán
jellemzése

A molekulatömeg-megoszlás meghatározása méretkizárá-
sos kromatográfiával

Az I. termék előállításánál alkalmazott módszereket követtük [3] A különböző tisztítási lépésekből kapott N-acetil-heparozán jellemzése: a molekulatömeg-megoszlás meghatározása méretkizárásos kromatográfiával; első és második módszer].

A "D" sarzs méretkizárásos kromatográfiája során kapott elválási profilból az következtethető, hogy a molekulatömeg-megoszlás polidiszperz, és a túlnyomórészt jelző csúcs megközelítőleg 110 000 D-nál van.

A "D" sarzs legalább 75%-os hányadának a molekulatömege $1,0 \times 10^4$ és $2,5 \times 10^5$ D között van.

Az uronsavak kvantitatív meghatározása

A "D" sarzs uronsavtartalma $2,0 \mu\text{mol/mg}$.

A szabad NH_2 -csoportok kvantitatív meghatározása

A "D" sarzs szabad NH_2 -csoport tartalma $0,1 \mu\text{mol/mg}$ értéknél kevesebb.

III. táblázat

A C és D közeg összetétele és előállítása

C közeg

A C közeg az alábbi három steril oldat kombinálásával állítjuk elő:

1. számú oldat

Az alábbi komponenseket az alábbi sorrendben 700 ml ultratiszta vizében oldjuk:

Komplexxképző szer: N-[trisz(hidroxi-metil)- -metil]-glicin (Tricine ^R , Fluka)		360 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O		280 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O		6,7 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O		1270 mg
K ₂ SO ₄		500 mg
KCl		5000 mg
Kazein-hidrolizátum (mint fő aminosav- forrás) HY CASE SFR ^R (Sheffield-cég)		25 000 mg
Élesztőkivonat ^R (Difco-cég)		18 000 mg
Nyomelemoldat (lásd a II. táblázatot az 1. termék előállításában)		1 ml

A fenti elegyhez egy Pasteur-pipettával néhány csepp Struktol J 673^R habzásgátló szert (a Schill és Seilacher cég

gyártmánya) adunk, és az oldat pH-értékét 1,38 sűrűségű kálium-hidroxid-oldattal 7,4-re állítjuk, majd az oldatot ultratiszta vízzel 850 ml-re töltjük, végül 45 percig 120 °C hőmérsékleten autoklávban sterilizáljuk.

2. számú oldat

5 g K_2HPO_4 -ot körülbelül 40 ml ultratiszta vízben oldunk, és az oldat térfogatát ultratiszta vízzel 50 ml-re egészítjük ki, majd az így kapott oldatot 0,2 μm szűrőnyílású (porozitású) szűrőn szűrjük.

3. számú oldat

20,7 g glicerint megfelelő mennyiségű ultratiszta vízben oldunk, és az oldat térfogatát ultratiszta vízzel 100 ml-re töltjük, majd az így kapott oldatot 110 °C hőmérsékleten 30 percig autoklávozzuk.

D közeg

A D közegét a C közeghez hasonlóan állítjuk elő, azzal az eltéréssel, hogy ajánlatos a habzásgátló szer hozzáadása után 20 g 7,2 pH-értékű 3-morfolino-propánszulfonsav puffer hozzáadása.

V. termék előállítása

Heparozán (40%-ban N-dezacetilezett származék) előállítása

3,7 g IV. termék ("D" sarzs) előállításában leírt N-ace-

til-heparozánt 74 ml 1 N nátrium-hidroxid-oldatban oldjuk, az oldatot 50 °C-ra melegítjük, és ezen a hőmérsékleten keverés közben, nitrogénatmoszférában 8 órán át keverve reagáltatjuk. Ezt követően a pH értékét 2 N sósavoldattal körülbelül 8-ra állítjuk, az így kapott oldatot ultratiszta vízzel dializáljuk, majd liofilizáljuk.

A liofilizálás után 2,91 g terméket kapunk: ez az "E" sarzs.

Az N-dezacetilezés foka (mértéke)

A liofilizálás elvégzése után kapott termék szabad NH_2 -csoportjainak kvantitatív meghatározása azt mutatta, hogy az N-acetil-heparozán 40%-ban N-dezacetileződött.

VI. termék előállítása

N-Szulfatált heparozán (80%-ban N-dezacetilezett származék) előállítása

A különböző kémiai módosítások céljára kiinduló anyagként egy "F" sarzsnak nevezett N-acetil-heparozánt alkalmazunk, amelyet a II. termék előállítása során leírt eljárással készítünk.

E termék uronsavtartalma 2,41 $\mu\text{mol/mg}$ -nak adódott.

a lépés: Részleges N-dezacetilezés

1,9 g "F" sarzsot 38,5 ml 2 N nátrium-hidroxid-oldatban oldunk, az oldatot 50 °C-ra melegítjük, és ugyanezen a hőmérsékleten nitrogénatmoszférában 8 órán át reagáltatjuk.

Ezt követően a pH értékét 2 N sósavoldattal 8,25-re ál-

lítjuk, az így kapott oldatot ultratiszta vízzel szemben dializáljuk, majd liofilizáljuk, s így 1,6 g terméket kapunk.

Az N-dezacetilezés foka (mértéke)

A szabad NH_2 -csoportok kvantitatív meghatározása szerint az N-acetil-heparozán 80%-ban dezacetileződött.

b lépés: N-Szulfatálás

1,33 g előző lépésben kapott terméket 57 ml ultratiszta vízben oldunk, hozzáadunk előbb 1,9 g nátrium-karbonátot, majd 1,9 g kén-trioxid/trimetil-amin komplexet, és az így kapott keveréket 20 órán át 55 °C hőmérsékleten tartjuk. Ekkor az oldat vezetőképességét ásványmentes víz hozzáadásával egy 0,5 M koncentrációjú konyhasóoldat vezetőképességére állítjuk be, és 4-szeres térfogat etanol hozzáadásával kicsapjuk a szilárd terméket. A csapadékot centrifugáljuk, az így kapott pelletet 0,5 M konyhasóoldatban felvesszük, ismét 4-szeres térfogatú etanolt adunk hozzá, és az így kicsapott szilárd terméket centrifugáljuk.

A pelletet ultratiszta vízben oldjuk, az így kapott oldatot az I. termék előállításában leírt módon ultratiszta vízzel szemben dializáljuk, majd liofilizáljuk.

Így 1,809 g N-szulfatált heparozánt nyerünk; ez az "F1" sarzs.

VII. termék előállítása

Kis molekulatömegű N-szulfatált heparozán (80% -ban N-dezacetilezett származék) előállítása salétromosavas depolimerizációval (a végső nitritkoncentráció 0,04 M)

a lépés: Hasítás nátrium-nitrittel

1 g VI. terméket 8 ml ultratiszta vízben oldunk, az oldat pH-értékét 2 N sósavoldattal 2,5-re állítjuk, és az így kapott oldathoz erőteljes keverés közben szobahőmérsékleten, nitrogénátvezetés közben 0,276 ml, 100 mg/ml koncentrációjú vizes nátrium-nitritoldatot adunk (a végső nitritkoncentráció: 0,04 M). Ezután a pH értékét azonnal 2,5-re állítjuk vissza 2 N sósavoldattal, és az oldatot 10 ml össztérfogatra töltjük. Az oldatot nitrogénáramban tartjuk 2 órán át keverés közben.

b lépés: A képződött 2,5-anhidromannóz-csoportok redukciója

Az oldat pH-értékét 2 N nátronlúgoldattal 7,0-ra állítjuk, 0,2 g nátrium-[tetrahidrido-borát]-ot adunk hozzá, majd az így kapott keveréket levegő jelenlétében 15 órán át szobahőmérsékleten keverjük.

Ekkor a bórhidrid feleslegét 10%-os ecetsavoldat hozzáadásával (amellyel 3,5-pH-értéket állítunk be) elbontjuk, utána a reakcióelegyet 15 percig keverjük, majd pH-értékét 2 N nátronlúgoldattal 7,0-ra állítjuk.

A reakció termékét 4-szeres térfogatú etanol hozzáadásával kicsapjuk, a csapadékot centrifugáljuk, tiszta etanollal mossuk, és vákuumban 60 °C hőmérsékleten szárítjuk.

Így 980 mg kis molekulatömegű, depolimerizált N-szulfatált heparozánt (80%-ban N-dezacetilezett származékot) kapunk, amely redukáló végződésén 2,5-anhidromannit-csoportot tartalmaz; ez a "G" sarzs.

A molekulatömeg-megoszlás meghatározása méretkizárásos HPLC módszerrel

A molekulatömeg megoszlását méretkizárásos HPLC módszerrel határoztuk meg az alábbi körülmények megtartásával:

Oszlop: TSK 2000 (Toyo Soda)

Mozgó fázis: 0,5 M vizes nátrium-szulfát-oldat

Áramlási sebesség: 1 ml/perc

Detektálás: UV fényben 205 nm hullámhosszon

A kalibrálást heparinból származó oligoszacharidok sorozatával végeztük, amint ezt az I. termék előállításánál leírtuk.

3) A különböző tisztítási lépésekből kapott N-acetil-heparozán jellemzése: a molekulatömeg-megoszlás meghatározása méretkizárásos kromatográfiával - első módszer).

Az eluálási profilból levezetett egyes eredményeinket az alábbi IV. táblázatban összegeztük.

A IV. táblázatban a rövidítések jelentése a következő:

- MW_1 jelenti a molekulatömeget olyan értelemben, hogy termék 1 tömeg%-os frakciójának a molekulatömege MW_1 -nél nagyobb;
- MW_2 jelenti a molekulatömeget olyan értelemben, hogy a termék 10 tömeg%-os frakciójának a molekulatömege MW_2 -nél nagyobb;

- MW_4 jelenti a molekulatömeget olyan értelemben, hogy a termék 10 tömeg%-os frakciójának a molekulatömege MW_4 -nél kisebb;
- MW_5 jelenti a molekulatömeget olyan értelemben, hogy a termék 1 tömeg%-os frakciójának molekulatömege MW_5 -nél kisebb; és
- MW_3 jelenti az abszorpció maximumnak megfelelő molekulatömeget.

IV. táblázat

A VII. termék molekulatömeg-megoszlása ("G" sarzs)

MW_1	MW_2	MW_3	MW_4	MW_5
16 939	8843	3716	1757	925

VIII. termék előállítása

Kis molekulatömegű N-szulfatált heparozán (80%-ban N-dezacetilezett termék) előállítása salétromosavas depolimerizációval (a végső nitritkoncentráció 0,03 M)

Az előállítást a VII. termék előállítása szerint végezzük azzal az eltéréssel, hogy 0,276 ml helyett 0,208 ml, 100 mg/ml koncentrációjú nátrium-nitrit-oldatot alkalmazunk.

Így 990 mg terméket kapunk; ez a "H" sarzs.

A molekulatömeg megoszlását a VII. termék előállításában leírt méretkizárásos HPLC módszerrel végeztük. Az eluálási profilból levezetett egyes eredményeinket az alábbi V. táblázatban összegeztük. Az V. táblázatban MW₁, MW₂, MW₃, MW₄ és MW₅ jelentése ugyanaz, mint a IV. táblázatban.

V. táblázat

A VIII. termék molekulatömeg-megoszlása ("H" sarzs)

MW ₁	MW ₂	MW ₃	MW ₄	MW ₅
19 856	11 146	5377	2460	1536

N,O-Szulfatált heparozán előállítása

1. példa

N,O-Szulfatált heparozánok: 80%-ban N-dezacetilezett származékok, amelyek szulfatálási foka (mértéke) 2,6

a lépés: A (tetrabutil-ammónium)-só képzése

800 mg VI. termék előállítása során kapott N-szulfatált heparozánt (a kiinduló anyagként alkalmazott N-acetil-heparozánt a IV. termék előállítására megadott módszerrel állítjuk elő) 100 ml vízben oldunk. Az így kapott oldatot divinil-benzollal térhálósított polisztirol-alapú ioncserélő oszlopra visszük (beszerzési helye: Dow Chemical; Dowex^R

50 W 8 20-50 Mesh), amelyet előzőleg savas közeggel készítettünk elő, s így a termék savas alakját regeneráljuk. Az eluátum pH-értékét 40 tömeg/térf. %-os (tetrabutil-ammónium)-hidroxid-oldattal 7-re állítjuk; az oldat adagolását akkor állítjuk le, amikor az eluátum teljesen semleges ($\text{pH} = 7$). Ezután az oldatot liofilizáljuk, s így 1,3 g cím szerinti sóterméket kapunk.

b lépés: O-Szulfatálás

Az előző lépésben kapott sót 80 ml formamidban oldjuk, és az oldathoz 5,6 g piridin/kén-trioxid komplexet (Aldrich-cég, hivatkozási száma S755-6) adunk. A reakcióelegyet 6 órán át 30°C hőmérsékleten reagáltatjuk, majd 16 ml 2 M konyhasóoldatot adunk hozzá. A pH értékét 5 N nátronlúgoldattal 7-re állítjuk, és kicsapás végett kétszeres térfogatú etanolt adunk hozzá. A csapadékot 0,5 M konyhasóoldatban felvesszük, és kétszeres térfogatú etanol hozzáadásával ismét kicsapjuk, majd az elegyet ultratiszta vízzel szemben dializáljuk, és forgóbepároló készülékben betöményítjük.

c lépés: Gélszűrés

Az előző b lépésben kapott tömény oldatot gélszűréssel frakcionáljuk: ehhez Sephacryl S 300 HR oszlopot és eluálószerként 0,5 M konyhasóoldatot alkalmazunk.

Azokat a frakciókat, amelyek 100 000 - 200 000 D átlagos molekulatömegű láncokból álló N,O-szulfatált heparozánt, valamint azokat a frakciókat, amelyek megközelítőleg 50 000 D és megközelítőleg 12 000 D közötti átlagos molekulatömegű láncokból álló N,O-szulfatált heparozánt tartalmaznak,

összegyűjtjük.

A fenti három frakció mindegyikéhez 5-szörös térfogatú etanolt adunk, majd az így kapott elegyeket ultratiszta vízzel szemben dialízisnek vetjük alá, és a dialízis után kapott oldatokat liofilizáljuk.

Így három sarzsban kapunk N,O-szulfatált heparozánt:

- Az "1A" sarzs olyan N,O-szulfatált heparozán, amely 150 000 és 200 000 D közötti átlagos molekulatömegű láncokból áll. Ez az N,O-szulfatált heparozán legalább 70% tömeg%-ban $1,0 \times 10^5$ és $5,0 \times 10^5$ D közötti molekulatömegű láncokból áll. Ezt az N,O-szulfatált heparozánt 0,140 g hozammal kapjuk.
- Az "1B" sarzs olyan N,O-szulfatált heparozán, amely megközelítőleg 50 000 D átlagos molekulatömegű láncokból áll. Ez az N,O-szulfatált heparozán legalább 70 tömeg%-ban $2,0 \times 10^4$ és $1,0 \times 10^5$ D közötti molekulatömegű láncokból áll. Ezt az N,O-szulfatált heparozánt 0,350 g hozammal kapjuk.
- Az "1C" sarzs olyan N,O-szulfatált heparozán, amely 12 000 D átlagos molekulatömegű láncokból áll. E terméket mintegy 0,100 hozammal kapjuk.

Az e példában leírt három N,O-szulfatált heparozán-sarzs jellemzőit a VI. táblázatban foglaltuk össze.

VI. táblázat

Az "1A", "1B" és "1C" sarzsoknak megfelelő N,O-szulfatált heparozánok jellemzői

	Uronsavtartalom $\mu\text{mol/mg}$	NH_2 -tartalom $\mu\text{mol/mg}$	A dezacetilezés foka	A szulfatálás foka (szulfát/karboxil arány)
"1A" sarzs	1,48	<0,01	80%	2,6
"1B" sarzs	1,45	<0,01	80%	2,6
"1C" sarzs	1,45	<0,01	80%	2,6

A szulfatálás foka - azaz a szulfát/karboxil arány - az egy diszacharid-egységben jelenlévő szulfátcsoportok átlagos számának és ugyanebben az egységben lévő karboxilcsoportok számának a hányadosa. Ezt az arányt vezetőképességi méréssel határozzuk meg egyrészt a szulfátcsoportok, másrészt a karboxilcsoportok számának kvitatív meghatározása [a módszer leírását lásd: Casu és munkatársai a következő helyen: Carbohydrate Research 39, 168-176 (1975)].

2. példa

N,O-Szulfatált heparozánok: 40%-ban N-dezacetilezett származékok, amelyek szulfatálási foka (mértéke) 2,1

a lépés: A (tetrabutil-ammónium)-só képzése

Kiinduló anyagként az V. terméket ("E" sarzsot) alkalmazzuk; a sót az előbbi 1. példa a lépésében leírt módszerrel állítjuk elő. A heparozán előállítására felhasznált N-acetil-heparozán kiinduló anyagot az I. termék előállítására leírt módszerrel kapjuk.

b lépés: Részleges N,O-szulfatálás

421 mg előző lépésben kapott sóterméket 35 ml dimetil-formamidban oldunk, és 3,71 g piridin/kén-trioxid komplexet adunk hozzá, majd a reakcióelegyet keverés közben szobahőmérsékleten 6 órán át reagáltatjuk. A reakcióelegyhez egységnyi térfogatra számítva addig adunk nátrium-kloridot, amíg az oldat nátrium-klorid koncentrációja a 0,33 M értéket el nem éri, majd az elegyhez kétszeres térfogatú etanolt adunk. Megvárjuk, amíg a csapadék teljesen leválik, majd az elegyet centrifugáljuk, és a felülúszót elvetjük. A pelletet 0,5 M konyhasóoldatban felvesszük, az oldatot közömbösítjük, és kétszeres térfogatú etanolt adunk hozzá. A csapadék teljes leválása után az elegyet centrifugáljuk, a kapott pelletet ultratiszta vízben felvesszük, és az így kapott oldatot ultratiszta vízzel szemben dializáljuk, majd liofilizáljuk.

A liofilizált termék jellemzői:

szabad NH_2 -tartalma 0,10 $\mu\text{mol/mg}$;

szulfatálási foka diszacharid-egységenként 1,9.

c lépés: Teljes N-szulfatálás

1 tömegrész N,O-szulfatált terméket 1 tömegrész nátrium-hidrogén-karbonáttal és 1 tömegrész kén-trioxid/trimetil-

-amin komplexszel az N,O-szulfatált termék 1 g-jára számított 20 ml ultratiszta vízben összekeverünk, majd a reakcióelegyet 55 °C hőmérsékleten keverés közben 20 órán át reagáltatjuk. Ekkor a reakcióelegyet 10-szeresére hígítjuk, és az így kapott oldat vezetőképességét 0,5 M konyhasóoldat vezetőképességével azonos értékre állítjuk.

Ezt követően kétszeres térfogatú etanol hozzáadásával kicsapjuk a terméket, amelyet centrifugálunk, majd a pelletet 0,5 M konyhasóoldatban felvesszük, és kétszeres térfogatú etanol hozzáadásával ismét kicsapjuk a terméket, amelyet ultratiszta vízben felvesszünk, ezt az oldatot ultratiszta vízzel szemben dializáljuk, az így kapott oldatot liofilizáljuk, és a liofilizált terméket vákuumban 40 °C hőmérsékleten szárítjuk. A liofilizált termék - jele: 2. sarzs - jellemzői az alábbiak:

szabad NH_2 -tartalma 0,02 $\mu\text{mol/mg}$;

szulfatálási foka diszacharid-egységenként 2,1.

Látható, hogy a megmaradó NH_2 -tartalom (0,02 $\mu\text{mol/mg}$) csekély, kevesebb, mint a részleges N,O-szulfatálási lépésben kapott N,O-szulfatált heparozán NH_2 -tartalma. Ez mutatja az N-szulfatálási reakció teljes végbemenetelét.

A 2. sarzs legalább 70 tömeg%-ban olyan láncokat tartalmaz, amelyek molekulatömege $2,0 \times 10^4$ D és $2,5 \times 10^5$ D közötti érték.

3. példa

N,O-Szulfatált heparozán: 80%-ban dezacetilezett származék, amelynek szulfatálási foka 2,6

3,35 g N-szulfatált heparozánt - amelyet a VI. termék előállításánál kivitelezett a és b lépésekben leírt eljárással állítottunk elő - alkalmaztunk kiinduló anyagként.

E vegyületet 4 g N-acetil-heparozánból kaptuk, amelyet a III. termék előállításánál leírt eljárással állítottunk elő.

A kiinduló anyagként alkalmazott N-szulfatált heparozán 70%-ban olyan termék, amely 20 000 és 150 000 D közötti molekulatömegű láncokból áll, és jellemzői az alábbiak:

uronsavtartalma 1,5 $\mu\text{mol/mg}$;

szabad NH_2 -tartalma 0,10 $\mu\text{mol/mg}$; és

dezacetilezési foka (mértéke) 80%.

a lépés: (Tetrabutil-ammónium)-só képzése

Az N-szulfatált heparozánt 400 ml ultratiszta vízben oldjuk és az ammóniumsót az 1. példa a lépésében leírt módon állítjuk elő. Liofilizálás után 6,66 g sóterméket kapunk.

b lépés: O-Szulfatálás

297 mg előző a lépésben kapott ammóniumsót 20 ml formamidban oldunk, 1 g piridin/kén-trioxid komplexet adunk hozzá, s utána az 1. példa b lépésében leírt módon járunk el. Így 260 mg N,O-szulfatált heparozánt kapunk; ez a 3. sarzs N,O-szulfatált heparozán, amelynek jellemzőit a VII. táblázatban foglaltuk össze.

VII. táblázat

A 3. sarzsnak megfelelő N,O-szulfatált heparozán
jellemzői

	Uronsavtartalom $\mu\text{mol/mg}$	NH ₂ -tartalom $\mu\text{mol/mg}$	A dezaceti- lezés foka	A szulfa- tálás foka (szulfát/kar- boxil arány)
3. sarzs	1,50	<0,02	80%	2,60

A 3. sarzsnak megfelelő N,O-szulfatált heparozán láncainak molekulatömeg-megoszlását méretkizárásos kromatográfiával határoztuk meg az I. termék előállítása során leírt módszerrel (első módszerrel).

Az abszorpciós maximumnak megfelelő molekulatömeg értéke 80 000 - 150 000 D tartományban van. A 3. sarzs legalább 70 tömeg%-ban olyan láncokat tartalmaz, amelyek molekulatömege $2,5 \times 10^4$ D és $2,5 \times 10^5$ D közötti, és legalább 60 tömeg%-ban tartalmaz olyan láncokat, amelyek molekulatömege $4,5 \times 10^4$ és $2,5 \times 10^5$ D közötti érték.

Nagy molekulatömegű N-szulfatált heparozánok és N,O-szulfatált heparozánok alkalmazása kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánok előállítására

4. példa

Kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozán előállítása nagy molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánból: 80%-ban dezacetilezett származék, amelynek szulfatálási foka 2,5

a lépés: (Tetrabutil-ammónium)-só képzése

E sőt az 1. példa a lépésében leírt módon állítjuk elő, kiinduló anyagként 5 g VI. terméknek megfelelő N-szulfatált heparozánt, megfelelő mennyiségű oldószereket és reagenseket alkalmazunk.

Liofilizálás után mintegy 9,3 g ammóniumsót kapunk.

b lépés: O-szulfatálás

8,10 g előző lépésben kapott ammóniumsót 450 ml vízmentes formamidban oldunk, és az így kapott oldatot 290 ml térfogatú, 4 Å pórusméretű molekulaszitát tartalmazó oszlopon vezetjük át. Ezután 27 g piridin/kén-trioxid-komplexet adunk hozzá, és a reakcióelegyet 30 °C hőmérsékleten 6 órán át állni hagyjuk.

Ezt követően a reakcióelegyhez olyan mennyiségben adunk 2 M konyhasóoldatot, hogy az oldat végső konyhasókoncentrációja 0,5 M legyen, majd az elegyet 1 N nátronlúgoldattal közömbösítjük, és kétszeres térfogatú etanolt hozzáadva kicsapást végzünk. A csapadékot 0,5 M konyhasóoldatban fel-

vesszük, és kétszeres térfogatú etanol hozzáadásával ismételtén kicsapjuk. Centrifugálás után a pelletet minimális mennyiségű vízben felvesszük, és 15 órán át dializáljuk, majd a dialízis után kapott oldatot liofilizáljuk, s így 5,8 g terméket kapunk.

c lépés: Depolimerizáció salétromossavval (a végső nitritkoncentráció 0,035 m)

2 g előző b lépésben kapott terméket 22 °C hőmérsékleten 17 ml ultratiszta vízben oldunk, és az oldatot 1 órán át vákuumban tartva gázmentesítjük. Ezt követően erőteljes keverés és nitrogénátvezetés közben a pH-t 5 N sósavoldattal 2,5-re állítjuk, és 0,484 ml 100 mg/ml koncentrációjú nátrium-nitrit-oldatot adunk hozzá.

A pH értékét azonnal visszaállítjuk 2,5-re, és az elegy térfogatát ultratiszta vízzel 90 ml-re egészítjük ki (a nátrium-nitrit végkoncentrációja a reakcióelegyben 0,035 M).

A keverést szobahőmérsékleten, nitrogénbevezetés közben 3 órán át folytatjuk, majd a pH értékét 5 N nátronlúgoldattal 7,0-ra állítjuk, és az elegyhez 0,4 g nátrium-[tetrahidrido-borát]-ot adunk. Az oldatot levegő jelenlétében 15 órán át keverjük, utána 30%-os ecetsavoldattal 3,5 pH-ra savanyítva a bórhidrid feleslegét elbontjuk, és a reakcióelegyet 15 percig erélyesen tovább keverjük levegő jelenlétében, majd a pH értékét 5 N nátronlúgoldat hozzáadásával 7-re állítjuk.

A fragmentált heparozánt úgy nyerjük ki, hogy az elegyhez 4-szeres térfogatú etanolt adunk, a csapadékot centrifu-

gáljuk, zsugorított Büchner-tölcséren szűrjük, etanollal mossuk, és vákuumban 60 °C hőmérsékleten szárítjuk.

Így 8,7 terméket kapunk.

d lépés: Gélszűrés

1,6 g előző c lépésben kapott terméket 15 ml 0,5 M konyhasóoldatban oldunk, és gélszűrésnek vetjük alá egy 5 cm x 100 cm méretű Sephacryl S 200 HR oszlopon (a Pharmacia-cég terméke), amelyet előzőleg 0,5 M konyhasóoldattal egyensúlyba hoztunk (áramlási sebesség 8 ml/perc). Az eluátumot 30-40 ml térfogatú frakciókban gyűjtjük. Valamennyi frakcióból származó N,O-szulfatált heparozán hasítási termék molekulatömegét méretkizárásos HPLC módszerrel értékeljük ki; ehhez a VII. termék előállítása során leírt módszer szerint, TSK 2000 oszlop alkalmazásával járunk el.

Egyesítjük azon frakciókat, amelyek átlagos molekulatömege megközelítőleg 5500 és 8000 D közötti tartományban van.

Az ezen frakciókban lévő termékeket úgy különítjük el, hogy 4-szeres térfogatú etanol hozzáadásával a terméket kicsapjuk, centrifugáljuk, majd dialízist végzünk, és a kapott oldatot liofilizáljuk.

Az így kapott, kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozán - amelyet 4. sarzsnak jelölünk - jellemzőit a VIII. táblázatban foglaltuk össze.

VIII. táblázat

A 4. sarzsnak megfelelő termék jellemzői

	Uronsavtartalom $\mu\text{mol/mg}$	NH_2 -tartalom $\mu\text{mol/mg}$	A dezacetil- lezés foka	A szulfa- tálás foka (szulfát/kar- boxil arány)
4. sarzs	1,40	<0,02	80%	2,50

A IX. táblázatban mutatjuk be azon láncok molekulatömeg-megoszlását, amelyekből a 4. sarzsnak megfelelő, kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozán áll. Ennek kiértékelését a VII. termék előállításánál leírt méretkizárásos HPLC módszerrel végeztük.

A IX. táblázatban MW_1 , MW_2 , MW_3 , MW_4 és MW_5 jelentése ugyanaz, mint a IV. táblázatban.

IX. táblázat

A 4. sarzsnak megfelelő termék molekulatömeg-megoszlása

MW_1	MW_2	MW_3	MW_4	MW_5
14 887	9445	6912	5067	2754

5. példa

Kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozán előállítása
nagy molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánból: 80%-ban
dezacetilezett, 2,9 szulfatálási fokú származék

a lépés: 80%-ban N-dezacetilezett, N-szulfatált heparozánszármazék depolimerizációja salétromos-savval (a végső nitritkoncentráció 0,035 M)

9 g VI. termékkel azonos N-szulfatált heparozánt 85 ml ultratiszta vízben 22 °C hőmérsékleten oldunk, és az oldatot 1 órán át vákuumban tartva gázmentesítjük. Ezután az oldatot erélyes keverés és nitrogénátvezetés közben 5 N sósavoldattal 2,5 pH-ra savanyítjuk, és 2,17 ml, 100 mg/ml koncentrációjú nátrium-nitrit-oldatot adunk hozzá. Közvetlenül ezután a pH értékét 2,5-re állítjuk vissza, és az elegy térfogatát ultratiszta vízzel 90 ml-re egészítjük ki (a reakcióelegy nátrium-nitrit-végkoncentrációja 0,035 M).

Az elegyet szobahőmérsékleten 3 órán át nitrogénáramban keverjük, majd pH-értékét 5 N nátronlúgoldattal 7,0-ra állítjuk, 1,8 g nátrium-[tetrahidrido-borát]-ot adunk hozzá, és az így kapott oldatot levegő jelenlétében 15 órán át keverjük. Ennek letelte után a bórhidrid feleslegét 30%-os ecetsavoldattal 3,5 pH-ra savanyítva elbontjuk, és a reakcióelegyet közben levegő jelenlétében további 15 percen át erélyesen keverjük, majd pH-értékét 5 N nátronlúgoldat hozzáadásával 7,0-ra állítjuk.

A fragmentált N-szulfatált heparozánt úgy különítjük el,

hogy az elegyhez 4-szeres térfogatú etanolt adunk, a kivált csapadékot centrifugáljuk, zsugorított Büchner-tölcséren szűrjük, etanollal mossuk, és 60 °C hőmérsékleten vákuumban szárítjuk.

Így végül 8,7 g terméket kapunk.

Az így kapott "5A" sarzsszámú N-szulfatált heparozán (80%-ban N-dezacetilezett származék) kis molekulatömegű láncainak molekulatömeg-megoszlását a VII. termék előállításában leírt méretkizárásos HPLC módszerrel állapítottuk meg.

A kromatográfiás profilból levezetett eredményeket a X. táblázatban mutatjuk be. E táblázatban MW₁, MW₂, MW₃, MW₄ és MW₅ jelentése ugyanaz, mint a IV. táblázatban.

X. táblázat

Az "5A" sarzsnak megfelelő termék molekulatömeg-megoszlása

MW ₁	MW ₂	MW ₃	MW ₄	MW ₅
14 282	8999	3805	2177	1536

Az "5A" sarzsszámú N-szulfatált heparozán valamennyi lánc a redukáló végződésén egy (c) általános képletű csoportot tartalmaz, ahol G jelentése hidrogénatom.

b lépés: Gélszűrés

1,6 g előző a lépésben kapott terméket 15 ml 0,5 M konyhasóoldatban oldva gélszűrésnek vetünk alá 5 cm x 100 cm méretű Sephacryl S 200 HR oszlopon (Pharmacia-cég), amelyet előzőleg 0,5 M konyhasóoldattal egyensúlyba hoztunk. A gélszűrést 8 ml/perc áramlási sebességgel végezzük. Az eluálást 30, egyenként 40 ml térfogatú frakcióban fogjuk fel. Valamennyi frakcióból származó heparozán hasítási termék molekulatömegét méretkizárásos HPLC módszerrel értékeltük ki; e célra a VII. termék előállításában leírt módszert és TSK 2000 oszlopot alkalmaztunk.

Egyesítettük azokat a frakciókat, amelyek egyrészt körülbelül 5000 D és 7000 D közötti átlagos molekulatömeggel rendelkeztek ("5B1" sarzs), másrészt, amelyek 3500 D és 5000 D közötti átlagos molekulatömegűek voltak ("5B2" sarzs).

Az "5B1" és "5B2" sarzsokban lévő, fragmentált N-szulfatált heparozánt úgy különítjük el, hogy 4-szeres térfogatú etanolt adunk hozzá, a kivált csapadékot centrifugáljuk, dializáljuk, és az így kapott oldatot liofilizáljuk.

Így végül 0,5 g hozammal kapjuk az "5B1" sarzsnek megfelelő terméket és 0,45 g hozammal az "5B2" sarzsnek megfelelő terméket.

E két heparozán molekulatömeg-megoszlását méretkizárásos HPLC módszerrel értékeltük ki (lásd a VII. termék előállítása során leírtakat), és eredményeinket a XI. táblázatban foglaltuk össze. E táblázatban az MW₁, MW₂, MW₃, MW₄ és MW₅

jelentése ugyanaz, mint a IV. táblázatban.

XI. táblázat

Az "5B1" és "5B2" sarzsoknak megfelelő termékek molekulatömeg-megoszlása

	MW ₁	MW ₂	MW ₃	MW ₄	MW ₅
"5B1" sarzs	9943	8051	6357	4611	2460
"5B2" sarzs	7800	6236	4088	2400	1536

c lépés: A kis molekulatömegű N-szulfatált, N-dezacetilezett heparozán-hasítási termékek O-szulfatálása

840 mg "5B1" sarzsból származó terméket (tetrabutil-ammónium)-sóvá alakítunk úgy, hogy előzőleg megsavanyított Dowex-gyantán vezetjük át, majd (tetrabutil-ammónium)-hidroxiddal közömbösítjük. Az így kapott oldatot liofilizálva jutunk a (tetrabutil-ammónium)-sóhoz.

I. eljárás: Szulfatálás piridin/kén-trioxid komplex alkalmazásával

420 mg N-szulfatált, N-dezacetilezett heparozánt a fentiek szerint készített (tetrabutil-ammónium)-sója alakjában 42 ml vízmentes formamidban oldunk (a fentebb megadott meny-

nyiség a sóvá még nem alakított N-szulfatált, N-dezacetilezett heparozánra vonatkozik). Az így kapott oldatot 15 ml térfogatú, 4 Å^o molekulaszitát tartalmazó oszlopon vezetjük át, majd 1,4 g piridin-kén-trioxid komplexet adunk hozzá, és a reakcióelegyet 6 órán át 30 °C hőmérsékleten tartjuk. Ezt követően 9 ml 2 M konyhasóoldatot adunk hozzá, és 1 N nátronlúgoldattal közömbösítjük.

Az így kapott N,O-szulfatált heparozánt kétszeres térfogatú etanollal kicsapjuk, centrifugáljuk, a pelletet ismét 10 ml 0,5 M konyhasóoldatban oldjuk, és kétszeres térfogatú etanol hozzáadásával ismét kicsapjuk. A centrifugálás után kapott pelletet minimális térfogatú vízben felvesszük, 15 órán át dializáljuk, végül a kapott oldatot liofilizáljuk.

Így 470 mg N,O-szulfatált heparozánt kapunk: ez az "5C1a" sarzs. E termék jellemzői azonosak a 4. példában leírt 4. sarzsszámú N,O-szulfatált heparozán jellemzőivel.

II. eljárás: Szulfatálás klór-szulfonsavval

A megmaradt 420 mg N-szulfatált, N-dezacetilezett heparozánt - (tetrabutyl-ammónium)-sója alakjában - 8 ml vízmentes formamidban oldjuk (a fenti mennyiség a sóvá még nem alakított N-szulfatált, N-dezacetilezett heparozánra vonatkozik). Az így kapott oldatot 15 ml térfogatú, 4 Å^o molekulaszitát tartalmazó oszlopon vezetjük át egy háromnyakú, ke-rekaljú, kalcium-kloridos szárítócsővel ellátott lombikban, és 346 µl vízmentes piridint adunk hozzá. Ehhez az oldathoz 1 ml diklór-metánban oldott 256 mg klór-szulfonsavat folya-

tunk nagyon lassú ütemben, erélyes keverés közben, gondosan ügyelve arra, hogy a reakcióelegy hőmérséklete 35 °C fölé ne emelkedjék (a hozzáadagolás időtartama 15 perc). Ezt követően az oldatot 2 órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd 10 ml 0,5 M konyhasóoldatot adunk hozzá, és 1 N nátronlúgoldattal közömbösítjük.

Az N,O-szulfatált heparozánt kétszeres térfogatú etanol hozzáadásával kicsapjuk, centrifugáljuk, és ismét oldjuk 10 ml 0,5 M konyhasóoldatban, kétszeres térfogatú etanol hozzáadásával ismét kicsapjuk, és centrifugáljuk. A pelletet minimális térfogatú vízben felvesszük, és 15 órán át kimerítően dializáljuk.

Az így kapott oldat liofilizálásával 430 mg terméket kapunk, ez az "5C1b" sarzs.

Ennek a kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánnak a jellemzői a XII. táblázatban találhatók.

XII. táblázat

Az "5C1b" sarzsnak megfelelő termék jellemzői

	Uronsavtartalom $\mu\text{mol/mg}$	NH ₂ -tartalom $\mu\text{mol/mg}$	A dezacetilezés foka	A szulfatálás foka (szulfát/karboxil arány)
5C1b sarzs	1,50	<0,02	80%	2,90

Az alábbi XIII. táblázatban foglaljuk össze azon láncok molekulatömeg-megoszlását, amelyek a "5C1b" sarzsnak megfelelő N,O-szulfatált heparozánt alkotják. A molekulatömeg-megoszlást a VII. termék előállításában leírt módszerrel, méretkizárásos HPLC elemzéssel értékeltük ki.

A XIII. táblázatban MW_1 , MW_2 , MW_3 , MW_4 és MW_5 jelentése ugyanaz, mint a IV. táblázatban.

XIII. táblázat

Az "5C1b" sarzsnak megfelelő termék molekulatömeg-
-megoszlása

MW_1	MW_2	MW_3	MW_4	MW_5
11 881	9116	7253	5513	3056

E termék 70%-ban olyan láncokból áll, amelyek molekula-tömege 8792 és 5900 D közötti érték.

Szabadalmi igénypontok

1. $1,5 \times 10^4$ és $4,0 \times 10^6$ dalton közötti molekulatömegű láncokból vagy azok keverékéből álló N,O-szulfatált heparozánok, azzal jellemezve, hogy a fenti láncok az (I) általános képletű, ismétlődő diszacharid-egységet tartalmazzák - ahol az (I) képletben

E a fenti N,O-szulfatált heparozánok diszacharid-egységeinek 0-80 százalékában acetilcsoportot, míg a többi diszacharid-egységben szulfátcsoportot vagy adott esetben hidrogénatomot jelent;

G jelentése hidrogénatom vagy szulfátcsoport - valamint a fenti N,O-szulfatált heparozánok gyógyászati szempontból elfogadható sói.

2. Az 1. igénypont szerinti N,O-szulfatált heparozánok, azzal jellemezve, hogy diszacharid-egységeik (I) képletében E jelentése acetilcsoport vagy szulfátcsoport.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti N,O-szulfatált heparozánok, azzal jellemezve, hogy szulfát/karboxil arányban (hányadosban) kifejezett szulfatálási fokuk $1,5$ és $3,0$ közötti érték.

4. Az 1. igénypont szerinti, $1,5 \times 10^4$ és $4,0 \times 10^6$ dalton közötti molekulatömegű láncokból vagy azok keverékéből álló N,O-szulfatált heparozánok, azzal jellemezve, hogy a fenti láncok az (I) általános képletű ismétlődő diszacharid-egységet tartalmazzák - ahol az (I) képletben

E a fenti N,O-szulfatált heparozánok diszacharid-egy-

ségeinek 0-80 százalékában acetilcsoportot, míg a többi diszacharid-egységben szulfátcsoportot vagy adott esetben hidrogénatomot jelent;

G jelentése hidrogénatom vagy szulfátcsoport;
szulfát/karboxil arányban (hányadosban) kifejezett szulfatálási fokuk 1,5 és 3,0 közötti érték;
a fenti N,O-szulfatált heparozánok láncainak két, redukáló és nem redukáló végződése: szulfatált vagy nem szulfatált uronsav-egység; szulfatált vagy nem szulfatált glükózamin; vagy szulfatált vagy nem szulfatált N-acetil-glükózamin -

valamint a fenti N,O-szulfatált heparozánok gyógyászati szempontból elfogadható sói.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti N,O-szulfatált heparozánok, azzal jellemezve, hogy a diszacharid-egységeiknek legfeljebb 60 százalékában van jelen acetilcsoport.

6. Az 1. igénypont szerinti N,O-szulfatált heparozánok, azzal jellemezve, hogy 0,2 $\mu\text{mol/mg}$ -nél kisebb mennyiségben tartalmaznak szabad amino-(NH_2) csoportot.

7. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti N,O-szulfatált heparozánok, azzal jellemezve, hogy legalább 70 tömegszázalékban olyan láncokból állnak, amelyek molekulatömege $1,0 \times 10^5$ és $5,0 \times 10^5$ dalton között van.

8. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti N,O-szulfatált heparozánok, azzal jellemezve, hogy legalább 70 tömegszázalékban olyan láncokból állnak, amelyek molekulatöme-

ge $2,5 \times 10^4$ és $2,5 \times 10^5$ dalton között van.

9. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti N,O-szulfatált heparozánok, azzal jellemezve, hogy legalább 70 tömegszázalékban olyan láncokból állnak, amelyek molekulatömege $2,0 \times 10^4$ és $1,0 \times 10^5$ dalton között van.

10. N,O-Szulfatált heparozántermék, azzal jellemezve, hogy legalább 70 tömegszázalék mennyiségben egy 1-9. igénypontok bármelyike szerinti N,O-szulfatált heparozánt tartalmaz.

11. Gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy hatóanyagként az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti N,O-szulfatált heparozánt vagy annak gyógyászati szempontból elfogadható valamely sóját a gyógyszerkészítésben szokásos hígítószerrel, vivő- és/vagy segédanyagokkal összekeverve tartalmazza.

12. Gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy hatóanyagként egy 10. igénypont szerinti N,O-szulfatált heparozánterméket vagy annak gyógyászati szempontból elfogadható valamilyen sóját a gyógyszerkészítésben szokásos hígítószerrel, vivő- és/vagy segédanyagokkal összekeverve tartalmazza.

13. Eljárás 70-100 tömegszázalék 1. igénypont szerinti N,O-szulfatált heparozántermék előállítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéssort hajtjuk végre:

- az a) lépésben egy Escherichia coli (K5) törzset tenyésztünk;
- a b) lépésben az így kapott N-acetil-heparozánt -

adott esetben előzetes tisztítás után - elkülönítjük és tisztítjuk olyan termék előállítására, mely 70-100 százalék $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ dalton közötti molekulatömegű láncok keverékéből álló N-acetil-heparozánt tartalmaz, s amely láncokra a (II) képletű, ismétlődő diszacharid-egység jellemző;

- a c) lépésben az így kapott N-acetil-heparozánterméket parciálisan dezacetilezzük, s így 70-100% olyan heparozánt tartalmazó terméket kapunk, amely $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti molekulatömegű láncok keverékéből áll, amely láncokra a (III) általános képletű ismétlődő diszacharid-egység jellemző - ahol a (III) képletben R' a diszacharid-egységek 0-80%-ában acetilcsoportot, míg a fennmaradó diszacharid-egységekben hidrogénatomot jelent;

- a d) lépésben

teljes vagy részleges N-szulfatálást hajtunk végre, s így 70-100% olyan N-szulfatált heparozánt kapunk, amely $1,0 \times 10^4$ és $2,0 \times 10^6$ D közötti molekulatömegű láncok keverékéből áll, s amely láncokra a (IV) általános képletű, ismétlődő diszacharid-egység jellemző - ahol a (IV) képletben E a diszacharid-egységek 0-80%-ában acetilcsoportot, míg a fennmaradó diszacharid-egységekben szulfátcsoportot vagy adott esetben

hidrogénatomot jelent;
majd a fenti parciális vagy teljes N-szulfatálási lépés után parciális vagy teljes O-szulfatálási lépést hajtunk végre;
vagy a kapott heparozánterméket parciális N,O-szulfatálási reakcióba visszük, vagy a kapott heparozánterméket parciális N,O-szulfatálásnak, és ezt követően teljes N-szulfatálásnak vetjük alá, és

a fenti a), b), c) és d) lépések befejezése után adott esetben egy vagy több lépésben a molekulatömegeket frakcionáljuk.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Escherichia coli* (K5) törzsként a [Pasteur Intézetben (Párizs, Franciaország) CNCM I-1013 letéti számon elhelyezett] SEBR 3282 törzset, vagy annak spontán vagy indukált mutánsát alkalmazzuk.

15. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Escherichia coli* (K5) törzs tenyésztését glicerinben dús tenyésztőközegben végezzük.

16. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az N-acetil-heparozán elkülönítése és tisztítása során legalább egy alkoholos kicsapási lépést és legalább egy ioncserélő kromatográfiás lépést hajtunk végre.

17. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az N-acetil-heparozán elkülönítését és tisztítását az alábbi lépéssorból álló eljárással végezzük:

- a₁) lépés: kicsapás etanollal;
- b₁) lépés: dialízis;
- c₁) lépés: kicsapás etanollal, majd dehidratálás és szárítás;
- d₁) lépés: tisztítás anioncserélő kromatográfiával;
- e₁) lépés: a d₁ lépésben kapott eluátum kicsapása etanollal, majd dehidratálás, szárítás és őrlés,

aminek során az a₁) és c₁) lépések egyike elhagyható.

18. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az N-acetil-heparozán elkülönítését és tisztítását az alábbi lépéssorból álló eljárással végezzük:

- a'₁ lépés: dialízis;
- b'₁ lépés: tisztítás savas közegben, és a 3,5-1,8 pH-értékű vizes oldatokban oldhatatlan szennyezések eltávolítása;
- c'₁) lépés: kicsapás etanollal, majd dehidratálás és szárítás;
- d'₁) lépés: alkálikus hidrolízis és dialízis;
- e'₁) lépés: tisztítás anioncserélő kromatográfiával;
- f'₁) lépés: tisztítás méretkizárásos kromatográfiával.

19. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az Escherichia coli (K5) törzs tenyésztésével kapott N-acetil-heparozánt - annak elkülönítése és tisztítása előtt - előzetes tisztításnak vetjük alá az alábbi lépéssorból álló eljárással:

- a"1) lépés: a tenyésztés végén kapott szuszpenzió

centrifugálása;

b"1) lépés: a felülúszó érintkeztetése alkálikus oldattal;

c"1) lépés: előszűrés;

d"1) lépés: koncentrálás előre meghatározott küszöbértékű méretkizáró membránon szűrés útján; és adott esetben

e"1) lépés: dialízis.

20. Eljárás gyógyászati készítmény előállítására, az-
zal jellemezve, hogy a 13. igénypont szerinti eljárással
előállított, 1-9. igénypontok bármelyike szerinti valamely
N,O-szulfatált heparozánt vagy annak gyógyászati szempontból
elfogadható sóját a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-
szerrel, vivő- és/vagy segédanyagokkal összekeverve gyógyá-
szati készítménnyé alakítjuk.

21. Eljárás gyógyászati készítmény előállítására, az-
zal jellemezve, hogy a 13. igénypont szerinti eljárással
előállított, 10. igénypont szerinti valamely N,O-szulfatált
heparozánterméket vagy annak gyógyászati szempontból elfo-
gadható sóját a gyógyszerkészítésben szokásos hígítószerrel,
vivő- és/vagy segédanyagokkal összekeverve gyógyászati ké-
szítménnyé alakítjuk.

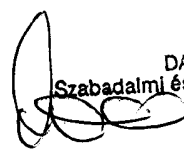
22. A 11. vagy 12. igénypont szerinti gyógyászati ké-
szítmény, mely a véralvadás szabályzására alkalmazható.

23. Az 1. igénypont szerinti nagy molekulatömegű,
(I) általános képletű diszacharid-egységeket tartalmazó lán-
cokból vagy azok keverékéből álló N,O-szulfatált heparozánok

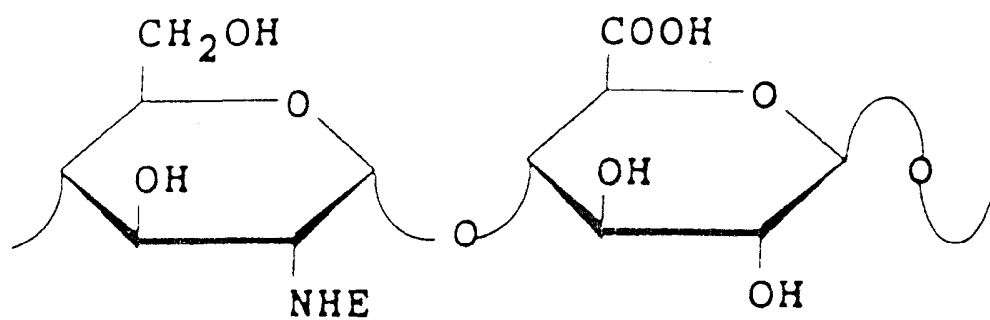
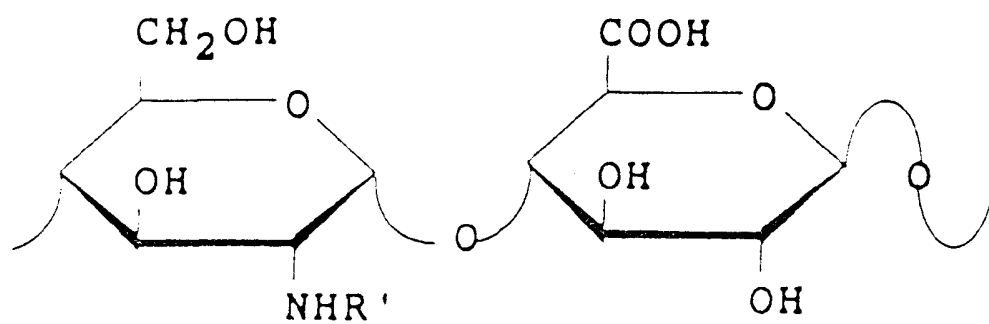
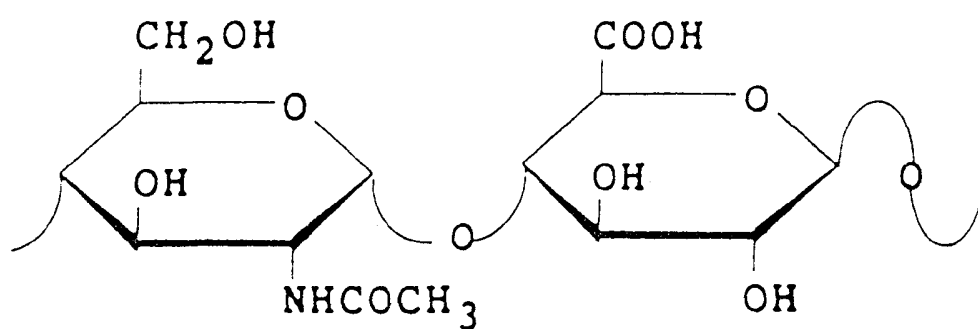
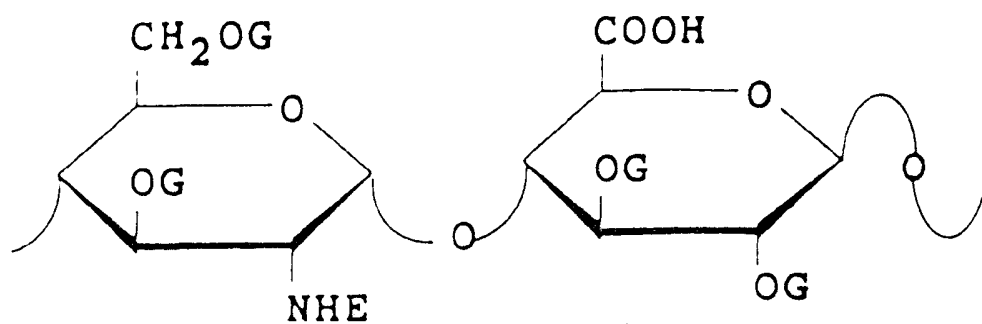
alkalmazása hasítás után olyan, kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánok előállítására, amelyek molekulatömege $1,5 \times 10^4$ daltonnál kisebb, $1,5 \times 10^3$ és $1,5 \times 10^4$ dalton közötti érték.

24. A (IV) általános képletű N-szulfatált heparozánok 13. szerinti alkalmazása hasítás után olyan, kis molekulatömegű N,O-szulfatált heparozánok előállítására, amelyek molekulatömege $1,5 \times 10^4$ daltonnál kisebb, $1,5 \times 10^3$ és $1,5 \times 10^4$ dalton közötti érték.

A meghatalmazott:

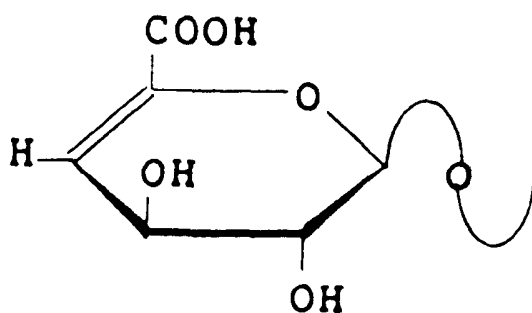
 DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
5.

2 lap r.p.
Szimond

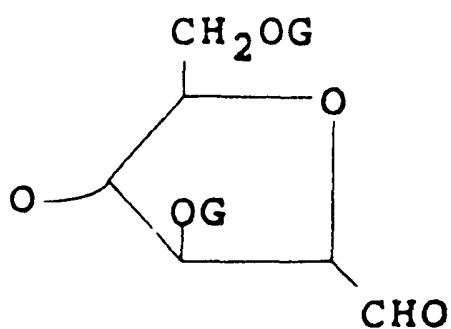


P 92 03757

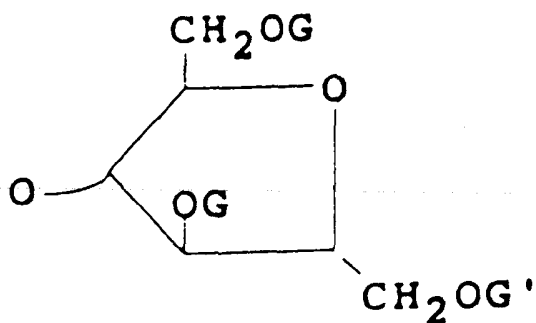
2/2



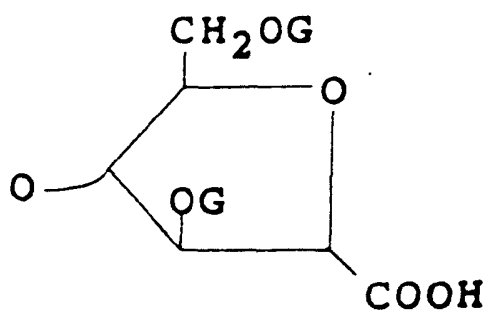
(a)



(b)



(c)



(d)