



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217193

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 06 05 60
(21) (PV 2999-60)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 31/715

(40)

(45) Vydáno 15 02 85

(75)
Autor vynálezu

ROUBAL ZDENĚK RNDr., TRČKA VÁCLAV MUDr., PAVLÍK VLASTIMIL ing., PRAHA

(54) Způsob výroby antilipemicky účinného přípravku

Vynález se týká způsobu výroby antilipemicky účinného přípravku.

Při posledních fázích výroby heparinu z hovězích plic, např. podle čs. patentu číslo 91 903, kdy jsou prakticky všechny bílkovinné a ostatní balastní látky odstraněny a konečný produkt se čistí acetonovou frakcencí, získá vedle vysoce aktivní heparinové frakce, použitelné k terapeutickým účelům (antikoagulační aktivita 100 až 130 m.j./mg), ještě značný podíl vedlejší polysacharidové frakce, která se vyznačuje velmi nízkou antikoagulační a antilipemickou aktivitou (15 až 30 m.j./mg) a která až dosud nebyla prakticky využitelná a představovala odpad. Podle okolností činí množství této vedlejší polysacharidové frakce 6-8násobek hmotnosti čistého heparinu.

Při podrobnějším studiu této polysacharidové frakce bylo zjištěno chromatografickou analýzou jejího hydrolyzátu, že jde o cukerný polykondensát, jehož chemické složení je velmi podobné heparinu, a v němž byla dokázána uronová kyselina a glukosemin. Pozoruhodný byl i nízký obsah síry (2,97 %) a vysoký obsah dusíku (7,03 %), ač bílkovinné složky nebyly chromatograficky zjištěny (reakce s ninhydrinem a bromfenolovou modří byla negativní). Optická aktivita $[\alpha]_D^{20} = +5^\circ$.

Jorpes (Heparin in the Treatment of Thrombosis, Oxford Press, 1946) uvádí, že běžný heparin může být nehomogenní směsí mono- (6,36 % S), di- (10,58 % S), tri- (13,58 % S) až tetrasírových esterů (15,81 % S, uvažuje-li se disacharidová jednotka jako základ heparinové makromolekuly) a zároveň připouští možnost existence samotného, síry prostého heparinového polysacharidu v organismu.

Jestliže by v případě výše popsané odpadní polysacharidové frakce šlo o látku, odpoví-
217193

dající obsahem síry uvedeným nejnižším esterům, měla by mít umělé sulfonace, tj. zvýšení obsahu estersírových skupin v molekule, za následek nejen nejvyšší možné zvýšení obsahu síry, nýbrž i zvýšení biologické aktivity. Tento předpoklad byl pokusně potvrzen. Sulfonací se zvýšil obsah síry z původních 2,97 % na 14,50 % a současně se zvýšila antikoagulační a antilipemická aktivita získaného produktu na hodnotu, odpovídající in vitro účinnosti vysoce aktivního heparinu, jak je patrné z tabulky:

látka	S	N	$[\alpha]_D^{20}$	antikoagul. aktivita	antilipem. aktivita
původní polysacharidová frakce	2,97%	7,03%	+ 5 °	15 až 30 m.j./mg	10 %
po sulfonaci	14,50%	1,96%	+ 1 °	100 až 120 m.j./mg	50 %

Antilipemická aktivita srovnávána s heparinem jako standardem = 100 %.

Předmětem vynálezu je způsob výroby antilipemicky účinného přípravku sulfonací polysacharidu kyselinou chlorsulfonovou v prostředí pyridinu nebo jiné heterocyklické terciární báze, při zvýšené teplotě 60 až 105 °C, hydrolyzou vzniklého sulfonačního produktu a jeho izolací srážením methanolem nebo ethanolom a převedením v sůl alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin, která se izoluje srážením methanolem nebo ethanolom, přičemž podstata způsobu podle vynálezu záleží v tom, že se jako výchozí látky použije polysacharidové frakce odpadající při výrobě a čištění heparinu z hovězích plic, charakterizované obsahem síry 2,5 až 3,5 %, obsahem dusíku 6,5 až 7,5 % a antikoagulační aktivitou in vitro 15 až 30 m.j./mg, přičemž se sulfonace vede až k dosažení obsahu síry 13 až 16 %, vztaženo na sušinu konečného produktu.

Při farmakologickém průzkumu antilipemicky účinného přípravku vyrobeného výše uvedeným způsobem, byla stanovena toxicita intravenosně na myších hodnotou LD_{50} = 450 až 650 mg/kg (toxicita heparinu stanovená tímž způsobem má hodnotu LD_{50} = 300 až 1 200 mg/kg). Perorální toxicitu přípravku se nepodařilo stanovit; ani při podání dávky 10 000 mg/kg u myši nebyly pozorovány toxické příznaky.

Ve srovnání s heparinem má přípravek podle vynálezu 80 % jeho antikoagulační aktivity.

Způsobem podle vynálezu je možno zpracovat a využít polysacharidovou frakci odpadající při výrobě heparinu v množství, které hmotnostně představuje několikanásobek výtěžku čistého heparinu a získat tak levnou, netoxickou a účinnou klinickou náhražku heparinu.

Příklad provedení

1 kg polysacharidové frakce, odpadající při výrobě heparinu, se sulfonuje ve směsi 1 litru chlorsulfonové kyseliny a 4 litrů bezvodého pyridinu při 100 °C do rozpuštění (asi 30 minut). Reakční směs se potom hydrolyzuje 5 litry studené vody a vzniklý čirý roztok se sráží trojnásobným objemem (30 litry) methanolu nebo ethanolu. Při tom se vyloučí pyridinová sůl polysírového esteru polysacharidu, která se izoluje a promývá třikrát po 10 litrech horkého methanolu nebo ethanolu za účelem odstranění zbytků sulfonačního média. Surový produkt se potom rozpustí v 10 litrech vody a alkalizuje koncentrovaným vodným roztokem hydroxidu sodného na pH 8,0 až 8,5. Tím se převede pyridinová sůl polysírového esteru polysacharidu v sůl sodnou, která se z roztoku sráží opět trojnásobným objemem methanolu nebo ethanolu a izoluje. Výtěžek je 1,0 až 1,2 kg suché substance s obsahem síry 14,5 %, dusíku 1,96 %, $[\alpha]_D^{20}$ = + 1 ° a antikoagulační aktivitou nejméně 100 m.j./mg (stanoveno thrombinovým testem podle Studera-Wintersteina).

Za účelem získání zcela bílého produktu je možno použít některého ze známých způsobů odbarvování heparinu, např. pomocí peroxidů nebo manganistanu draselného.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby antilipemicky účinného přípravku sulfonací polysacharidu kyselinou chlorsulfonovou v prostředí pyridinu nebo jiné heterocyklické terciární báze, při zvýšené teplotě 60 až 105 °C, hydrolýzou vzniklého sulfonačního produktu a jeho izolací srážením methanolem nebo ethanolem a převedením v sůl alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin, která se izoluje srážením methanolem nebo ethanolem, vyznačující se tím, že se jako výchozí látky použije polysacharidové frakce odpadající při výrobě a čištění heparinu z hovězích plic, charakterizované obsahem síry 2,5 až 3,5 %, obsahem dusíku 6,5 až 7,5 % a antikoagulační aktivitou in vitro 15 až 30 m.j./mg, přičemž se sulfonace vede až k dosažení obsahu síry 13 až 16 %, vztaženo na sušinu konečného produktu.