



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102952202 A

(43) 申请公布日 2013.03.06

(21) 申请号 201110245021.6

(22) 申请日 2011.08.25

(71) 申请人 苏州鸿洋医药科技有限公司

地址 215100 江苏省苏州市吴中区东吴北路
31 号

(72) 发明人 王芑

(51) Int. Cl.

C08B 37/10 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

一种超低分子肝素钠的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种超低分子肝素钠的制备方法,该方法将普通肝素在有机溶剂中进行 β -消除降解后得到超低分子肝素钠,再经过精制纯化得到医用超低分子肝素钠。本发明提供的制备方法可行且降解条件温和,保证了最终产物的抗凝活性。按照本方法制备的超低分子肝素钠的抗 FXa 效价在 140 ~ 200IU/mg (典型值为 160~180IU/mg)、抗 FIIa 效价在 0.5 ~ 2IU/mg (典型值为 0.5 ~ 1IU/mg),平均分子量在 1600 ~ 3000Da (典型值为 1800 ~ 2400Da),其中肝素六糖片段的含量为 40 ~ 50%。按照本方法制得的超低分子肝素钠适合于抗凝、抗血栓的临床使用,给药方法为皮下注射,给药剂量为成人每天一次 20 ~ 100mg。

1. 一种超低分子肝素钠的制备方法,其特征在于包括如下步骤:
 - (1) 取精品肝素的水溶液,加入季铵盐,得到白色肝素季铵盐固体;
 - (2) 上述(1)中的肝素季铵盐固体溶解于有机溶剂中,加入氯化苄得到肝素酯化物;
 - (3) 上述(2)中的肝素酯化物溶于水,加入季铵盐,得到白色肝素酯化物季铵盐固体;
 - (4) 上述(3)中的肝素酯化物的季铵盐溶于有机溶剂中,在有机碱作用下进行 β -消除降解;
 - (5) 上述(4)中的降解物在氢氧化钠作用下转化为钠盐,得到精品超低分子肝素钠的粗品;
 - (6) 上述(5)中得到的超低分子肝素钠经沉淀、精密过滤、冷冻干燥得到医用超低分子肝素原料药。
2. 按照权利要求1所述一种超低分子肝素钠的制备方法,其特征在于:制备步骤(1)中所述季铵盐为苄索氯铵。
3. 按照权利要求1所述一种超低分子肝素钠的制备方法,其特征在于:制备步骤(4)中所述有机溶剂为无水二氯甲烷。
4. 按照权利要求1所述一种超低分子肝素钠的制备方法,其特征在于:制备步骤(4)中所述有机碱为苄基三甲基氢氧化铵。
5. 按照权利要求1所述一种超低分子肝素钠的制备方法,其特征在于:按照本制备方法制得的超低分子肝素钠为抗FXa效价在140~200IU/mg、抗FIIa效价在0.5~2IU/mg,平均分子量在1600~3000Da,肝素六糖片段的含量为40~50%。
6. 按照权利要求5所述一种超低分子肝素钠的制备方法,其特征在于:按照本制备方法制得的超低分子肝素钠为抗FXa效价在160~180IU/mg、抗FIIa效价在0.5~1IU/mg,平均分子量在1800~2400Da,肝素六糖片段的含量为40~50%。
7. 按照权利要求5所述一种超低分子肝素钠的制备方法,其特征在于:步骤(1)所述精品肝素中含有的硫酸皮肤素 $\leq 1\%$ 。
8. 权利要求7制备的医用超低分子肝素钠在制备抗凝、抗血栓药物中的应用。

一种超低分子肝素钠的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种超低分子肝素钠(ULMWH)的制备方法及其所述超低分子肝素钠的药物应用。

背景技术

[0002] 肝素是一种来自于动物的硫酸化多糖,在临床上常被作为主要的抗凝、抗血栓药物来使用。但由于使用肝素有较高的出血危险性,它的使用需要进行医务观察,并及时调整剂量,因此它的临床使用有很大的局限性。

[0003] 低分子肝素是从普通肝素通过不同的方法降解得到的小分子肝素制品,具有生物利用率高、血浆半衰期长等优点,特别是其引起的出血副作用大幅降低。但低分子肝素的抗FIIa值仍旧较高,如通过专利EP0040144方法制备得到的低分子肝素的抗FIIa值在30左右,抗FXa/抗FIIa的比值在3.5~5.5。使用这类低分子肝素,虽然较普通肝素的安全性有大幅提高,但仍有一定的出血危险性。同样,在美国专利US6384021中报道了一种很低分子量肝素的合成方法,虽然得到的很低分子量肝素的分子量较低,但它的抗FXa值不超过120IU/mg,抗FXa/抗FIIa比值在15~50之间。

[0004] 超低分子肝素是比低分子肝素钠平均分子量更小(通常低于3000道尔顿),抗FIIa值更低的一类肝素衍生物。与低分子肝素相比,超低分子肝素具抗凝作用安全,其抗血栓作用强,皮下注射易吸收,主要用于血栓栓塞性疾病的预防,如肾病综合症,手术后静脉血栓的形成、老年静脉血栓和心脑血管疾病的预防以及防治高血脂症等。中国专利CN200810020765报道了超低分子肝素的一种制备方法,但利用这种制备方法得到的超低分子肝素抗FXa活性低,难以满足临床要求,且工业化生产的可行性不高。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种超低分子肝素钠的制备方法,该制备方法降解条件温和可减少磺酸基从肝素上的脱落,通过该方法制备的超低分子肝素钠平均分子量小于3000Da,具有高抗FXa生物活性。

[0006] 为解决以上技术问题,本发明一种超低分子肝素钠的制备方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 取精品肝素配成10%的水溶液,室温下边搅拌边加入季铵盐如苄索氯铵,1~2小时后停止搅拌,沉降、倾倒、洗涤沉淀物,最后过滤、干燥,得到白色肝素季铵盐固体;

[0008] (2) 将(1)中的肝素季铵盐固体溶解于有机溶剂(无水二氯甲烷)中配成5%~10%的溶液,加入与肝素季铵盐等量的氯化苄,30℃~35℃下,搅拌反应24小时后,冷至室温,加入2倍体积的10%醋酸钠/甲醇溶液,搅拌30分钟后,静置沉淀,过滤,甲醇洗涤,室温下真空干燥,得到肝素的酯化物;

[0009] (3) 将(2)得到的肝素酯化物溶于10倍的水中配成溶液,将2.3~2.5倍的酯化物量的苄索氯铵溶于10倍的水中,完全溶解后,室温、剧烈搅拌下将此溶液慢慢加入到肝素酯化物的水溶液中;添加完成后,继续搅拌1-2小时,然后停止搅拌;待白色固体沉降后,

倾去上层清液,加水洗涤,过滤,再洗涤,然后真空干燥(不高于 50℃),得到肝素酯化物的季铵盐;

[0010] (4) 将(3)得到的肝素酯化物的季铵盐溶于 10 倍的干燥的二氯甲烷中,待溶解后,加入 0.05 ~ 0.5 摩尔浓度的有机碱如苄基三甲基氢氧化铵、在温度为 30℃ ~ 35℃ 下反应 4 ~ 24 小时(优选 8 ~ 12 小时)进行 β -消除降解;

[0011] (5) 将(4)反应结束后的降解物,在室温下加入两倍体积的 10% 的醋酸钠的甲醇溶液,搅拌 1 ~ 2 小时后,在 0℃ ~ 4℃ 下沉降、过滤、甲醇洗涤,在 25℃ ~ 35℃ 下真空干燥,得到超低分子肝素钠的粗品;

[0012] (6) 上述(5)中的超低分子肝素钠粗品配成 10% 的溶液,0℃ ~ 4℃ 下加入氢氧化钠溶液,调 pH 在 9 ~ 10,并在此温度下反应 3 小时;而后用 1M 盐酸中和,加入氯化钠至浓度为 8 ~ 10%,用 5 倍的甲醇沉淀,沉淀物用甲醇洗涤,真空干燥;

[0013] (7) 上述(6)中的低分子肝素钠粗品配成 10% 的溶液,1M 氢氧化钠溶液,调 pH 值为 9 ~ 10,加入 30% 的过氧化氢室温搅拌 6 小时后,滴加 1M 的盐酸至中性,然后加入 8 ~ 10% 的氯化钠,再用 5 倍的甲醇沉淀超低分子肝素钠;过滤,用甲醇洗涤后干燥制得低分子肝素钠的精品;

[0014] (8) 将上述(7)得到的产物溶于水配成 10% 的溶液后,添加氯化钠至浓度为 10%,用 5 倍体积的甲醇沉淀,过滤,甲醇洗涤,真空干燥得到超低分子肝素钠精品;

[0015] (9) 将上述(8)得到的精品超低分子肝素钠溶解于去离子水配成 10% 的溶液,用 0.2 微米的膜过滤后,冷冻干燥,最终得到医用超低分子肝素钠,其抗 FXa 效价在 140 ~ 200IU/mg(典型值为 160 ~ 180IU/mg),抗 FIIa 效价在 0.5 ~ 2IU/mg(典型值为 0.5 ~ 1IU/mg),平均分子量在 1600 ~ 3000Da(典型值为 1800 ~ 2400Da),其中肝素六糖占总超低分子肝素的比例在 40 ~ 50%。

[0016] 本发明还提供了医用超低分子肝素钠在制备抗凝、抗血栓药物中的应用,作为抗凝、抗血栓药物,所述制备方法步骤(1)中使用的精品肝素来自于猪小肠,且其中含有的硫酸皮肤素 $\leq 1\%$;本发明制备的医用超低分子肝素经配制、过滤、灌装、灭菌、质量检查、包装灭菌等常规注射剂制备工艺,可制成供皮下注射的注射剂,用药量为成人每天一次 20 ~ 100mg。

[0017] 与现有技术相比,本发明具有的有益效果为:

[0018] 1、本发明提供的制备方法是将普通肝素制成肝素酯化物的季铵盐在有机溶剂中进行 β -消除降解,减少了磺酸基从肝素上脱落,制备方法可行且降解条件温和,因而保证了最终产物的高抗凝活性。

[0019] 2、按照本方法制备的超低分子肝素钠的抗 FXa 效价在 140 ~ 200IU/mg、抗 FIIa 效价在 0.5 ~ 2IU/mg,平均分子量在 1600 ~ 3000Da,其中肝素六糖片段的含量为 40 ~ 50%。

具体实施方式

[0020] 实施例 1

[0021] 取 100 克的精品肝素钠溶解于 1 升水,然后在快速搅拌下加入含 270 克苄索氯铵的水溶液 600 毫升,反应 2 小时后,加入 2 升水,静止沉降,倾倒去上部清液,再加水洗涤,然后过滤,水洗涤,干燥,约得到 270 克的肝素季铵盐;

[0022] 取上述反应得到的肝素季铵盐 100 克溶解于 500 毫升的二氯甲烷中, 室温下加入 100 毫升的氯化苄, 在 30-35℃ 下反应 24 小时后, 加入 1.2 升的 10% 醋酸钠甲醇溶液, 搅拌 20 分钟后, 沉降、过滤、甲醇洗涤、干燥, 得到肝素酯化物 44 克;

[0023] 将 10 克肝素酯化物溶于 200 毫升水中配成溶液, 室温、快速搅拌下加入含 23 克苄索氯铵的 100 毫升的水溶液, 反应 2 小时后, 沉降, 用水洗涤, 45-50℃ 下真空干燥, 得到 22 克肝素酯化物的季铵盐;

[0024] 将 10 克肝素酯化物的季铵盐溶于 100 毫升干燥的二氯甲烷中, 室温下加入 17 毫升的苄基三甲基氢氧化铵, 在 35℃ 下搅拌反应 24 小时。反应结束后, 冷却到室温, 加入 200 毫升的 10% 醋酸钠甲醇溶液, 继续搅拌 1 小时, 静止沉降, 过滤, 甲醇洗涤, 室温真空干燥, 得到 3.6 克超低分子肝素粗品;

[0025] 将得到的粗品超低分子肝素钠 3 克溶于 30 毫升水, 0℃ 下加入 1M 的氢氧化钠调 pH 到 9.5, 搅拌反应 3~4 小时后, 加入 30% 的过氧化氢至浓度为 0.5-1%, 室温下搅拌 6 小时后, 用 1M 的盐酸调溶液到中性, 加入氯化钠, 使得氯化钠的浓度为 8%, 用 100 毫升的甲醇沉淀。过滤, 甲醇洗涤, 45-50℃ 下真空干燥, 得到半精制产品 2.6 克;

[0026] 将半精品超低分子肝素钠 1 克溶于 10 毫升配成 10% 的溶液, 加入 10 克氯化钠溶解后, 加入 50 毫升甲醇沉淀, 4℃ 静止放置 4 小时后过滤, 甲醇洗涤, 室温下真空干燥, 得到 0.8 克超低分子肝素钠精品;

[0027] 将 0.8 克超低分子肝素钠溶于去离子水配成 10% 溶液, 用 0.2 微米的膜过滤, 冷冻干燥, 最终得到医用超低分子肝素钠。

[0028] 上述超低分子肝素钠的平均分子量为 2400Da, 肝素六糖片段占总量的 45%, 抗 FXa (抗凝血因子 a) 值为 165IU/mg, 抗 FIIa (凝血酶) 值为 0.6IU/mg。

[0029] 实施例 2

[0030] 将 100 毫克超低分子肝素溶于 2.5 毫升 0.5% 的生理盐水中, 0.2 微米的膜过滤后, 样品进行大鼠 (体重为 140~160g) 皮下注射, 注射剂量为 2 毫克/只, 分别于注射后 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 小时各点采取 0.5 毫升血清, 进行抗 FXa 分析, 达峰时间 T_{max} 约为 2 小时, 12 小时后药物在老鼠血液中基本消失。