

Diss. ETH, Ex. B
Diss ETH No 9997

ORAL ABSORPTION OF DERMATAN SULFATE

DISSERTATION
Submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH
for the Degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by
JOÃO TRANSMONTANO RAIMUNDO
Licenciati Gradu, University of Lisbon
born on April 27, 1963
Citizen of Portugal

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. P. Merkle, Examiner
Prof. Dr. P. P. Speiser, Co-Examiner
PD Dr. O. Vaizoglu, Co-Examiner

ABSTRACT

The main goal of this thesis is to obtain a dermatan sulfate derivative suitable for oral administration in the antithrombotic and anticoagulant therapy.

Dermatan sulfate, a glycosaminoglycan with anticoagulant and antithrombotic properties, shows poor oral absorption. To increase its bioavailability after oral administration six new derivatives were synthesized.

Unfractionated dermatan sulfate and low molecular weight dermatan sulfate were bound directly to the position 2 of a diglyceride (1,3-dipalmitin). They were also bound to the same position but via a spacer (succinic acid). Benzethonium chloride was also added to both dermatan sulfate (unfractionated and low molecular weight) to form a salt.

The physico-chemical characterization of the different derivatives showed that some have very different properties from the original compound (e.g. benzethonium dermatan sulfate). All the compounds obtained were less water soluble than the original compound. The infrared spectra and the elementary analysis of the different compounds confirmed the esterification. The molecular weight determination using two methods (gel permeation and dynamic light scattering) gave different results. Of all the derivatives prepared only poly-O-[3-(1,3-dipalmitoyloxypropane-2-oxycarbonyl) propanoyl] dermatan sulfate batch 52 showed some tensioactivity. The proton NMR spectra of unfractionated dermatan sulfate and low molecular weight dermatan sulfate presented only slight differences.

The glyceride derivatives after suspended in an aqueous medium built vesicles in the nanometer range (pharmacosomes®). Mixed micellar solutions, composed of taurocholate, monoolein and dermatan sulfate, with a particle size of 32-39 nm were also prepared. The biological tests performed showed that some of the derivatives have some potential to be

suitable for oral administration. Dermatan sulfate was found to be stable at acidic pH and hydrolysis of the derivatives released the original compound with its original pharmacological properties.

The experiments performed in rats and rabbits showed that whereas some of the derivatives did not improve the anticoagulant effect of dermatan sulfate, others presented some positive results. New aspects about the distribution of the glycosaminoglycans in the organism are also presented. It is also given a possible explanation about the hemorrhagic effect observed during anticoagulant therapy with heparin.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Hauptziel dieser Dissertation ist es, geeignete oral applizierbare Derivate von Dermatansulfat für die antithrombotische und gerinnungshemmende Therapie zu erhalten.

Dermatansulfat, ein Glycosaminoglycan mit gerinnungshemmenden und antithrombotischen Eigenschaften, weist eine geringe orale Absorption auf. Es wurden sechs neue Derivate synthetisiert, um die Bioverfügbarkeit nach oraler Anwendung zu erhöhen.

Unfraktionierte und niedermolekulare Dermatansulfate wurden direkt an der Position 2 mit einem Diglycerid (1,3-Dipalmitin) verestert. Ebenso wurden sie an der gleichen Position über einen "Spacer" (Bernsteinsäure) verestert. Benzethoniumchlorid wurde ebenfalls mit beiden Dermatansulfaten (unfraktioniertes und niedermolekulares) kombiniert, um Salze zu bilden.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der verschiedenen Derivate zeigen, dass einige davon sehr verschiedene Eigenschaften gegenüber der Originalverbindung (z.B. Benzethonium-Dermatansulfat) aufweisen. Alle synthetisierten Substanzen wiesen eine geringere Wasserlöslichkeit als die ursprüngliche Substanz auf. Die Infrarotspektren sowie die Elementaranalysen der verschiedenen Komponenten bestätigen die Veresterung. Die beiden Molekulargewichtsbestimmungen (Gel Permeation und Dynamische Lichtstreuung) ergaben verschiedene Ergebnisse. Von allen hergestellten Derivaten zeigt nur poly-O-[3-(1,3-Dipalmitoyloxypropane-2-oxycarbonyl) propanoyl] Dermatansulfat Charge 52 eine Grenzflächenaktivität. Die Protonen-NMR-Spektren der unfraktionierten und niedermolekularen Dermatansulfate weisen nur geringe Unterschiede auf.

Die Glyceride wurden im wässrigen Milieu suspendiert und dabei bildeten sich Vesikeln im Nanometer-Bereich (Pharmakosomen®). Es wurden auch gemischte Mizellen, zusammengesetzt aus Taurocholat, Monoolein und Dermatansulfat, mit einer Partikelgröße von 32-39 nm vorbereitet. Die

durchgeführten biologischen Tests zeigten, dass einige Derivate ein Potential für die orale Verabreichung besitzen.

Dermatansulfat ist im sauren pH-Bereich stabil und setzt bei der Hydrolyse der Derivate den ursprünglichen Wirkstoff wieder frei, wobei die pharmakologischen Eigenschaften nicht verlorengehen.

Die durchgeführten Tierexperimente an Ratten und Kaninchen zeigten, dass einige Derivate keine verbesserte gerinnungshemmende Wirkung von Dermatansulfat aufwiesen. Hingegen waren bei anderen Derivaten jedoch positive Ergebnisse festzustellen. Neue Erkenntnisse über die Verteilung von GAG im Organismus werden dargestellt. Es wird eine mögliche Erklärung für den hemorrhagischen Blutungseffekt während der antikoagulativen Therapie mit Heparin erörtert.