



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 134**

51 Int. Cl.:  
**C08B 37/10** (2006.01)  
**A61K 31/727** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01955436 .9**  
96 Fecha de presentación : **18.07.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1307491**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2003**

54 Título: **Mezclas de polisacáridos derivados de heparina, su preparación y las composiciones farmacéuticas que los contienen.**

30 Prioridad: **21.07.2000 FR 00 09572**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2010**

73 Titular/es: **Aventis Pharma S.A.**  
**20, avenue Raymond Aron**  
**92160 Antony, FR**

72 Inventor/es: **Díaz, Jacques;**  
**Pecquet, Christelle;**  
**Perrin, Elisabeth y**  
**Viskov, Christian**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 347 134 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Mezclas de polisacáridos derivados de heparina, su preparación y las composiciones farmacéuticas que los contienen.

La presente invención se refiere a mezclas de polisacáridos derivados de heparina, a su procedimiento de preparación y a las composiciones farmacéuticas que las contienen.

La heparina es una mezcla de mucopolisacáridos sulfatados de origen animal, utilizada principalmente por sus propiedades anticoagulantes y antitrombóticas.

La heparina presenta sin embargo inconvenientes que limitan las condiciones de su utilización. En particular, su actividad anticoagulante (actividad anti-IIa) importante puede ocasionar hemorragias.

Se han propuesto las heparinas de bajo peso molecular obtenidas por despolimerización básica de ésteres de heparina (EP40144); sin embargo, estos productos tienen todavía una actividad anti-IIa importante.

La patente EP 1 070 503 (Artículo 54(3) CBE) describe mezclas de polisacáridos que presentan un peso molecular de 2.000 a 4.000 daltons, una actividad anti-Xa comprendida entre 100 y 150 UI/mg y una relación anti-Xa/anti-IIa comprendida entre 15 y 50.

Este documento divulga específicamente:

- una heparina de peso molecular medio de 2.777 daltons que presenta una actividad anti-Xa de 100 UI/mg y una actividad anti-IIa de 4 UI/mg,
- una heparina de peso molecular medio de 2.161 daltons que presenta una actividad anti-Xa de 100 UI/mg y una actividad anti-IIa de 2 UI/mg.

La invención se refiere a mezclas de polisacáridos derivados de heparina que poseen una actividad más selectiva frente al factor X activado (factor Xa) y el factor II activado (factor IIa) que la heparina.

La presente invención tiene más particularmente por objeto las mezclas de polisacáridos sulfatados que poseen la estructura general de los polisacáridos que constituyen la heparina y que presentan las características siguientes:

- tienen un peso molecular medio de 1.500 a 3.000 daltons, una actividad anti-Xa de 100 a 150 UI/mg, una actividad anti-IIa de 0 a 10 UI/mg y una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 10,

con la excepción:

- o de un polisacárido que presenta un peso molecular de 2.777 daltons, una actividad anti-Xa de 100 UI/mg y una actividad anti-IIa de 4 UI/mg,
- o de un polisacárido que presenta un peso molecular de 2.161 daltons, una actividad anti-Xa de 100 UI/mg y una actividad anti-IIa de 2 UI/mg,
- los polisacáridos que constituyen las mezclas contienen 2 a 26 restos sacarídicos y tienen un resto de ácido glucurónico-4,5 insaturado 2-O-sulfato en uno de sus extremos,

en forma de una sal de metal alcalino o alcalinotérreo.

Como la sal de metal alcalino o alcalinotérreo, se prefieren las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio.

El peso molecular medio se determina por cromatografía líquida de alta presión utilizando dos columnas en serie por ejemplo las comercializadas con el nombre de TSK G3000 XL y TSK G2000 XL. La detección se realiza por refractometría. El eluyente utilizado es nitrato de litio y el caudal es 0,6 ml/min. El sistema se calibra con estándares preparados por fraccionamiento de la enoxaparina (AVENTIS) por cromatografía en gel de agarosa-poliacrilamida (IBF). Esta preparación se realiza según la técnica descrita por Barrowcliffe *et al.*, *Thromb. Res.*, 12, 27-36 (1977-78) o D.A. Lane *et al.*, *Thromb. Res.*, 12, 257-271 (1977-78). Los resultados se calculan mediante el programa informático GPC6 (Perkin Elmer).

La actividad anti-Xa se mide por el método amidolítico sobre un sustrato cromogénico descrito por Teien *et al.*, *Thromb. Res.*, 10, 399-410 (1977), con como patrón el primer patrón internacional de las heparinas de bajo peso molecular.

## ES 2 347 134 T3

La actividad anti-IIa se mide por la técnica descrita por Anderson L.O. *et al.*, *Thromb. Res.*, 15, 531-541 (1979), con como patrón el primer patrón internacional de las heparinas de bajo peso molecular.

5 Preferentemente, las mezclas tales como las descritas más arriba presentan una actividad anti Xa comprendida entre 125 y 150 UI/mg.

Muy particularmente, las mezclas tales como las descritas más arriba presentan una actividad anti Xa comprendida entre 140 y 150 UI/mg y tienen un peso molecular medio comprendido entre 2.000 y 3.000 dalton.

10 Preferentemente, las mezclas según la invención tienen una actividad anti-IIa de 0 a 5 UI/mg.

Aún más preferentemente, las mezclas presentan una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 25.

15 Las mezclas de oligosacáridos según la invención pueden prepararse por despolimerización de una sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina en medio orgánico, mediante una base orgánica fuerte de pKa superior a 20 elegida entre 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3,2-diazafosforina, las bases de la familia de las guanidinas y los fosfacenos, o de imidazolato de sodio, transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada en sal de sodio, saponificación del éster y opcionalmente purificación.

20 La sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina es preferentemente la sal de bencetonio, de cetilpiridinio o de cetiltrimetilamonio.

25 La despolimerización se efectúa generalmente en un disolvente orgánico inerte tal como un disolvente clorado (diclorometano por ejemplo), tetrahidrofurano, anisol, a una temperatura de -20°C a 40°C.

Las bases de la familia de las guanidinas son preferentemente las de fórmula:

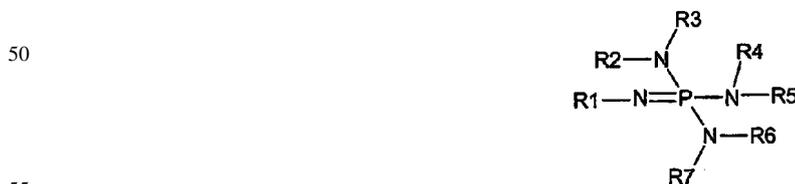


en la que R<sub>1</sub> es hidrógeno o alquilo, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> idénticos o diferentes representan cada uno un radical alquilo.

40 Más particularmente, R<sub>1</sub> es hidrógeno y R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son radicales metilo.

Las bases orgánicas fuertes emparentadas con la familia de los fosfacenos se definen por ejemplo según R. Schwesinger *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26, 1167-1169 (1987), R. Schwesinger *et al.*, *Angew. Chem.* 105, 1420 (1993).

45 Entre las bases de la familia de los fosfacenos se utilizan, preferentemente, las de fórmula:



en la que los radicales R<sub>1</sub> a R<sub>7</sub> son idénticos o diferentes y representan radicales alquilo.

60 En las fórmulas anteriores, los radicales alquilo contienen 1 a 6 átomos de carbono en cadena recta o ramificada.

Ventajosamente, la relación en mol base orgánica fuerte de pKa superior a 20 o imidazolato de sodio/sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina está comprendida entre 0,2 y 5 y, preferentemente, entre 1 y 4.

65 Más particularmente, la tasa de esterificación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina está comprendida entre 50 y 100% y, preferentemente, entre 70 y 90%. Esta tasa de esterificación corresponde al porcentaje molar de esterificación de los ácidos urónicos de la heparina.

## ES 2 347 134 T3

La transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada en sal de sodio se efectúa, generalmente, por tratamiento del medio de reacción con una disolución alcohólica de acetato de sodio y, preferentemente, con una disolución al 10% de acetato de sodio en metanol (peso/volumen), a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C. El equivalente en peso de acetato añadido es preferentemente 3 veces superior a la masa de sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina aplicada en la reacción de despolimerización.

La saponificación se efectúa generalmente mediante un hidróxido de metal alcalino tal como sosa, potasa, hidróxido de litio, en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre 0 y 20°C y, preferentemente, entre 0 y 10°C. Se utilizarán de forma general de 1 a 5 equivalentes molares de hidróxido de metal alcalino. Preferentemente, la saponificación se realizará en presencia de 2 a 3 equivalentes molares de hidróxido de metal alcalino.

El producto final puede purificarse opcionalmente por cualquier método conocido de purificación de las heparinas despolimerizadas y principalmente según el método descrito en la patente EP 0037319. Preferentemente, se purifica mediante peróxido de hidrógeno, en medio acuoso, a una temperatura de 10 a 50°C. Preferentemente, esta operación se realizará entre 20 y 40°C.

La sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina puede prepararse según el esquema de reacción siguiente:

- a) transformación de la heparina en forma de sal de sodio mediante cloruro de bencetonio para obtener el heparinato de bencetonio,
- b) esterificación de la sal de bencetonio obtenida anteriormente mediante cloruro de bencilo y tratamiento con una disolución alcohólica de acetato de sodio para obtener la sal de sodio del éster bencílico de la heparina,
- c) transalificación de la sal de sodio del éster bencílico de la heparina en sal de amonio cuaternario y, preferentemente en sal de bencetonio, de cetilpiridinio o de cetiltrimetilamonio,

La reacción de la etapa a) se realiza en medio acuoso, por acción del cloruro de bencetonio en exceso, sobre la heparina en forma de sal de sodio, a una temperatura cercana a 15 a 25°C. De manera ventajosa, la relación molar cloruro de bencetonio/heparina en forma de sal de sodio está comprendida entre 2 y 3 y más particularmente 2,5.

La heparina en forma de sal de sodio de partida utilizada es preferentemente una heparina de cerdo. Ésta puede purificarse previamente para disminuir su tasa de dermatán sulfato según el procedimiento descrito en la patente FR2663639.

La esterificación de la etapa b) se efectúa preferentemente en un disolvente orgánico clorado (cloroformo, cloruro de metileno por ejemplo), a una temperatura comprendida entre 25 y 45°C y, preferentemente entre 30 y 40°C. El éster en forma de sal de sodio se recupera por precipitación mediante acetato de sodio al 10% en peso/volumen en un alcohol tal como metanol. Se emplean generalmente 1 a 1,2 volúmenes de alcohol por volumen de medio de reacción. La cantidad de cloruro de bencilo y el tiempo de reacción se adaptan para obtener una tasa de esterificación comprendida entre 50 y 100% y, preferentemente, entre 70 y 90%. De forma preferente, se utilizan 0,5 a 1,5 partes en peso de cloruro de bencilo para 1 parte en peso de la sal de bencetonio de la heparina. Asimismo, de forma preferente, el tiempo de reacción estará comprendido entre 10 y 35 horas.

La transalificación de la etapa c) se efectúa mediante un cloruro de amonio cuaternario y, preferentemente, mediante cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio o cloruro de cetiltrimetilamonio, en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre 10 y 25°C. De manera ventajosa, la relación en mol cloruro de amonio cuaternario/sal de sodio del éster bencílico de la heparina está comprendida entre 2 y 3.

Las mezclas según la invención en forma de sal de sodio, pueden transformarse en otra sal de un metal alcalino o alcalinotérreo. Se pasa opcionalmente de una sal a otra utilizando el método descrito en la patente US4168377.

Las mezclas según la invención no son tóxicas y pueden utilizarse así como medicamentos.

Las mezclas de la presente invención pueden utilizarse como agentes antitrombóticos. En particular, son útiles para la prevención de las trombosis venosas, de los accidentes trombóticos arteriales, principalmente en el caso del infarto de miocardio. Son útiles igualmente en la prevención y el tratamiento de la proliferación de las células musculares lisas, de la angiogénesis, y como agentes neuroprotectores de la aterosclerosis y de la arteriosclerosis.

La presente invención se refiere igualmente a las composiciones farmacéuticas que contienen como principio activo una mezcla de polisacáridos según la invención opcionalmente en asociación con uno o varios excipientes inertes.

Las composiciones farmacéuticas son por ejemplo disoluciones inyectables por vía subcutánea o intravenosa. Son útiles igualmente por vía pulmonar (inhalación).

## ES 2 347 134 T3

La posología puede variar en función de la edad, del peso y del estado de salud del paciente. Para un adulto, está comprendida en general entre 20 y 100 mg al día por vía intramuscular o subcutánea.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

### Ejemplo A

#### *Preparación de la sal de bencetonio del éster bencílico de la heparina*

##### *Heparinato de bencetonio*

A una disolución de 10 g de heparina en forma de sal de sodio en 100 ml de agua a una temperatura cercana a 20°C, se añade una disolución de 25 g de cloruro de bencetonio en 125 ml de agua. El producto se filtra, se lava con agua y se seca.

##### *Éster bencílico de heparina (sal de sodio)*

A una disolución de 20 g de heparinato de bencetonio en 80 ml de cloruro de metileno, se añaden 16 ml de cloruro de bencilo. La disolución se calienta a una temperatura de 30°C durante 12 horas. Se añaden 108 ml de una disolución al 10% de acetato de sodio en metanol, se filtra, se lava con metanol y se seca. Se obtienen así 7,6 g de éster bencílico de heparina en forma de sal de sodio cuya tasa de esterificación es 77%.

##### *Éster bencílico de heparina (sal de bencetonio)*

En un erlenmeyer A de 2 litros, se introducen 36 g (0,0549 moles) de éster bencílico de heparina (sal de sodio) y 540 ml de agua destilada. Después de homogeneizar a una temperatura de aproximadamente 20°C, se obtiene una disolución amarilla clara. Con agitación magnética, se prepara en un erlenmeyer B de 1 litro, una disolución de 64,45 g (0,1438 moles) de cloruro de bencetonio y de 450 ml de agua. La disolución del erlenmeyer B se vierte en aproximadamente 35 minutos en la disolución del erlenmeyer A con agitación. Se observa la formación de un precipitado blanco abundante. El erlenmeyer B se lava con 200 ml de agua destilada y el agua de lavado se introduce en el erlenmeyer A. La agitación se para y se deja depositar la suspensión durante 12 horas. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla), se añaden 560 ml de agua y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado en 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (560 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se repite dos veces esta operación de lavado con aproximadamente 560 ml de agua destilada. En la última operación de lavado, se deja el precipitado en suspensión y se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta se lava 4 veces con 200 ml de agua destilada. El sólido blanco húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 87,5 g de éster bencílico de heparina, sal de bencetonio. El rendimiento obtenido es 94,9%.

### Ejemplo 1

(Referencia)

#### *Despolimerización y transformación en sal de sodio*

En un erlenmeyer A de 50 ml, se introducen 28 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 4 g (0,00238 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Después de la disolución completa, se añaden 1,32 g (0,00948 moles) de 1,5,7-triazabicyclo [4.4.0]dec-5-eno. Se agita a una temperatura cercana a 20°C, durante 3 horas y 30 minutos. Durante este tiempo, se prepara a 4°C en un erlenmeyer B, una disolución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en la disolución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso cuasi-translúcido. La agitación se para y se deja decantar la suspensión durante una hora. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (62 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (49 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 4. La torta amarilla oro obtenida se lava 2 veces con 25 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 1,21 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es 77,2%.

## ES 2 347 134 T3

### *Saponificación*

En un erlenmeyer de 25 ml, se introducen 1,21 g (0,0018 moles) de la heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente y 11 ml de agua. Con agitación magnética, se introducen 0,18 ml (0,0018 moles) de detergente de sosa al 30%. Después de la adición, la mezcla se enfría a 4°C y se agita durante 2 horas. Se añaden 1,43 g de NaCl y se neutraliza la disolución por adición de HCl a 1 mol/l (14 ml). La mezcla se trasvasa a un erlenmeyer de 100 ml y se añaden 52 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado amarillo. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a 20°C. El sobrenadante se recoge y se separa (44 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se añaden 25 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (21 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 25 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta amarilla clara obtenida se lava 2 veces con 10 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 0,66 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 60%.

### *Purificación*

En un erlenmeyer de 10 ml, se introducen 0,66 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 5,9 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa a 0,1 mol/l, se lleva el pH entre 9 y 10 y se añaden 33 microlitros de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de aproximadamente 2 horas de agitación, se añaden 0,65 g de cloruro de sodio. La mezcla se neutraliza por adición de HCl a 0,1 mol/l. La disolución se filtra y se trasvasa a un erlenmeyer de 25 ml. Se vierten 23,3 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado blanco. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a 20°C. El sobrenadante se recoge y se separa (5 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla), se añaden 5 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (5 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 5 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava 2 veces con 5 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 0,51 g de una mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 77,2%.

Las características de esta mezcla son las siguientes:

- Peso molecular medio: 1.600 daltons
- Actividad anti-Xa: 94 UI/mg
- Actividad anti-IIa: < 0,1 UI/mg
- Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: >100

### Ejemplo 2

#### *Despolimerización y transformación en sal de sodio*

En un erlenmeyer A de 100 ml, se introducen 70 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 10 g (0,00595 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Después de la disolución completa, se añaden 1,7 ml (0,00587 moles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3,2-diazafosforina. A una temperatura cercana a 20°C, se deja que la reacción continúe durante aproximadamente 3 horas y 30 minutos. Durante este tiempo, se prepara a 4°C en un erlenmeyer B, una disolución de 30 g de acetato de sodio en 300 ml de metanol. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en la disolución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso cuasi-transparente. La agitación se para y se deja decantar la suspensión durante una hora. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (204 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se añaden 125 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (162 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 125 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. El precipitado gelatinoso en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta gelatinosa amarilla obtenida se lava con 2 partes de 63 ml de metanol. El sólido gelatinoso se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 3,34 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es 85,3%.

65

## ES 2 347 134 T3

### *Saponificación*

Se saponifican 1,67 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente según el procedimiento de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtienen 0,94 g de un polvo amarillo claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es 61%.

### *Purificación*

Se purifican 0,94 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) obtenida anteriormente según el procedimiento de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtienen 0,71 g de un polvo blanco. El rendimiento es 75,5%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las características siguientes:

Peso molecular medio: 2.500 Daltons

Actividad anti-Xa: 146,6 UI/mg

Actividad anti-IIa: 2,15 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 68

### Ejemplo 3

(Referencia)

### *Despolimerización y transformación en sal de sodio*

En un erlenmeyer A de 50 ml, se introducen 28 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 4 g (0,00238 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de bencetonio) obtenido según el ejemplo A. Después de la disolución completa y de enfriar a 2°C, se añaden 0,333 g (0,00239 moles) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno. A una temperatura cercana a 20°C, se deja que la reacción continúe durante aproximadamente 3 horas y 30 minutos. Durante este tiempo, se prepara a 4°C en un erlenmeyer B, una disolución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en la disolución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo. La agitación se para y se deja decantar la suspensión durante una hora. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (90 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (61 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 4. La torta obtenida se lava 2 veces con 25 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 1,19 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El sólido es amarillo intenso. El rendimiento obtenido es 75,9%.

### *Saponificación*

Se saponifican 1,19 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente según el procedimiento de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtienen 0,78 g de un polvo amarillo claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es 71,5%.

### *Purificación*

Se purifican 0,78 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) obtenida anteriormente según el método de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtienen 0,58 g de un polvo blanco. El rendimiento es 72,5%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las características siguientes:

Peso molecular medio: 2.700 Daltons

Actividad anti-Xa: 100,1 UI/mg

Actividad anti-IIa: 3,3 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 27,3

## ES 2 347 134 T3

### Ejemplo 4

#### *Despolimerización y transformación en sal de sodio*

5 En un erlenmeyer A de 50 ml, se introducen 28 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 4 g (0,00238 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Después de la disolución completa y a 2°C, se añaden 0,6 ml (0,00222 moles) de 2-terc-butilimino-tris(dimetilamino)fosforano. A una temperatura cercana a 0°C, se deja que la reacción continúe durante aproximadamente 3 horas y 30 minutos. Durante este tiempo, se prepara a 4°C en un erlenmeyer B, una disolución de  
10 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en la disolución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso cuasi-transparente. La agitación se para y se deja decantar la suspensión durante una hora. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (108 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarillenta), se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante  
15 se recoge y se separa (60 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. El precipitado blanco amarillento en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 4. La torta obtenida se lava 2 veces con 25 ml de metanol. El sólido se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 1,22 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es 77,8%.

#### *Saponificación*

25 Se saponifican 1,22 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente según el protocolo de saponificación descrito en el ejemplo 1.

Se obtienen 0,69 g de un polvo amarillo muy claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es 61,6%.

#### *Purificación*

30 Se purifican 0,69 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) obtenida anteriormente según el protocolo de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtienen 0,67 g de un polvo blanco. El rendimiento es 97,1%.

35 La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las características siguientes:

Peso molecular medio: 2.900 Daltons

40 Actividad anti-Xa: 145,2 UI/mg

Actividad anti-IIa: 4,5 UI/mg

45 Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 32,6

### Ejemplo 5

#### *Despolimerización y transformación en sal de sodio*

50 En un matraz A de 50 ml, se introducen 28 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 4 g (0,00238 moles) de heparinato de bencilo (tasa de esterificación: 77%, sal de bencetonio). Después de la disolución completa y a 40°C, se añaden 0,95 g (0,00949 moles) de imidazolato de sodio. A reflujo de diclorometano, se deja que la reacción continúe durante aproximadamente 4 horas. Durante este tiempo, se prepara a 4°C en un erlenmeyer B, una disolución  
55 de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en la disolución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso cuasi-transparente. La agitación se para y se deja decantar la suspensión durante una hora. La parte transparente del sobrenadante naranja se recoge y se separa (88 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla naranja), se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante  
60 se recoge y se separa (51 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. El precipitado naranja en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 4. La torta obtenida se lava 2 veces con 25 ml de metanol. El sólido se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 1,34 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio).

65 El rendimiento obtenido es 76,6%.

## ES 2 347 134 T3

### *Saponificación*

Se saponifican 1,2 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente según el protocolo de saponificación descrito en el ejemplo 1.

Se obtienen 0,63 g de un polvo beige. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es 52,5%.

### *Purificación*

Se purifican 0,63 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) obtenida anteriormente según el método de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtienen 0,42 g de un polvo blanco beige. El rendimiento es 66,7%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las características siguientes:

Peso molecular medio: 2.250 Daltons

Actividad anti-Xa: 134,5 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1,5 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 90,5

### Ejemplo 6

(Referencia)

### *Despolimerización y transformación en sal de sodio*

En un erlenmeyer A de 50 ml, se introducen 28 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 4 g (0,00238 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Después de la disolución completa, se añaden 1,33 g (0,00956 moles) de 1,5,7-triazabicyclo [4.4.0]dec-5-eno. Se agita a una temperatura cercana a 20°C, durante 3 horas y 30 minutos. Durante este tiempo, se prepara a 4°C en un erlenmeyer B, una disolución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en la disolución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso cuasi-translúcido. La agitación se para y se deja decantar la suspensión durante una hora. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (56 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se añaden 60 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (70 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 4. La torta amarilla oro obtenida se lava 2 veces con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 0,92 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es 64%.

### *Saponificación*

En un erlenmeyer de 25 ml, se introducen 0,92 g (0,0014 moles) de la heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente y 17,5 ml de agua. Con agitación magnética, se introducen 0,38 ml (0,00379 moles) de detergente de sosa al 30%. Después de la adición, la mezcla se mantiene a una temperatura cercana a 20°C y se agita durante 5 horas. Se añaden 1,8 g de NaCl y se neutraliza la disolución por adición de HCl concentrado (volumen final de la disolución aproximadamente 18 ml). La mezcla se trasvasa a un erlenmeyer de 100 ml y se añaden 46 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado amarillo. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a 20°C. El sobrenadante se recoge y se separa (52 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se añaden 25 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 1 hora aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (27 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 25 ml de metanol y se agita durante 1 hora aproximadamente. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 4. La torta obtenida se lava 2 veces con 10 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 3 horas de secado, se obtienen 0,42 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 45,6%.

### *Purificación*

En un erlenmeyer de 10 ml, se introducen 0,42 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 3,8 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 38°C con agitación magnética. Por adición de sosa a 0,1 mol/l, se lleva el pH entre 9 y 10 y se añaden 25 microlitros de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. Después

## ES 2 347 134 T3

de aproximadamente 2 horas 30 minutos de agitación, se añaden 0,5 g de cloruro de sodio. La mezcla se neutraliza por adición de HCl a 0,1 mol/l. La disolución se filtra y se trasvasa a un erlenmeyer de 25 ml. Se vierten 11,3 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado blanco. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a 20°C. El sobrenadante se recoge y se separa (9,8 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla), se añaden 5 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 3 horas aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (6,2 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 5 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava 2 veces con 5 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de aproximadamente 2 horas 20 minutos de secado, se obtienen 0,39 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 92,8%.

Las características de la heparina despolimerizada así obtenida son las siguientes:

Peso molecular medio: 1.950 daltons

Actividad anti-Xa: 115,6 UI/mg

Actividad anti-IIa: < 2 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: >57

### Ejemplo 7

#### Despolimerización y transformación en sal de sodio

En un reactor A de 400 ml, se introducen 140 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 20 g (0,0119 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Después de la disolución completa, se mide el contenido en agua del medio de reacción por el método de Karl Fisher. El valor obtenido es 0,1% de agua. Se añaden 3,5 ml (0,0121 moles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3,2-diazafosforina. A una temperatura cercana a 25°C, se deja que la reacción continúe durante aproximadamente 24 horas. Durante este tiempo, se prepara a 4°C en un erlenmeyer B, una disolución de 30 g de acetato de sodio en 300 ml de metanol. Con agitación magnética, la mitad de la mezcla de reacción del reactor A se vierte en la disolución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso cuasi-transparente. La agitación se mantiene durante una hora y se deja decantar la suspensión durante aproximadamente 12 horas a 4°C. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (220 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se añaden 220 ml de metanol y se agita durante 50 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 40 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (204 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 204 ml de metanol y se agita durante 40 minutos. El precipitado gelatinoso en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta gelatinosa amarilla obtenida se lava con 2 partes de 100 ml de metanol. El sólido gelatinoso se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de aproximadamente 12 horas de secado, se obtienen 2,6 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es 70,6% (calculado sobre la base de la mitad del medio de reacción tratada).

#### Saponificación

Se saponifican 2,6 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente según el procedimiento de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtienen 1,48 g de un polvo amarillo claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es 62,9%.

#### Purificación

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 1,48 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 15 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa a 1 mol/l, se lleva el pH entre 9 y 10. La disolución se filtra sobre una membrana filtrante de porosidad 1  $\mu$ m. Se añaden 76 microlitros de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de aproximadamente 2 horas de agitación, se añaden 1,5 g de cloruro de sodio. La mezcla se neutraliza por adición de HCl a 1 mol/l. La disolución se filtra sobre una membrana filtrante de porosidad 1  $\mu$ m. Se vierten 38 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado blanco. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 1 hora a una temperatura cercana a 20°C. El sobrenadante se recoge y se separa (37 ml). Sobre el precipitado, se añaden 37 ml de metanol y se agita durante 45 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 45 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se separa (34 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 34 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava 2 veces con 25 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtienen 1,29 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 87,2%.

## ES 2 347 134 T3

La heparina despolimerizada purificada (sal de sodio) obtenida presenta las características siguientes:

Peso molecular medio: 2.250 Daltons

5 Actividad anti-Xa: 149,6 UI/mg

Actividad anti-IIa: 0,85 UI/mg

10 Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 176

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Mezclas de polisacáridos sulfatados que poseen la estructura general de los polisacáridos que constituyen la heparina y que presentan las características siguientes:

- tienen un peso molecular medio de 1.500 a 3.000 daltons, una actividad anti-Xa de 100 a 150 UI/mg, una actividad anti-IIa de 0 a 10 UI/mg y una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 10, con la excepción:
    - o de un polisacárido que presenta un peso molecular de 2.777 daltons, una actividad anti-Xa de 100 UI/mg y una actividad anti-IIa de 4 UI/mg,
    - o de un polisacárido que presenta un peso molecular de 2.161 daltons, una actividad anti-Xa de 100 UI/mg y una actividad anti-IIa de 2 UI/mg,
  - los polisacáridos que constituyen las mezclas contienen 2 a 26 restos sacarídicos y tienen un resto de ácido glucurónico-4,5 insaturado 2-O-sulfato en uno de sus extremos,
- en forma de una sal de metal alcalino o alcalinotérreo.

2. Mezclas según la reivindicación 1 **caracterizadas** porque la actividad anti Xa está comprendida entre 125 y 150 UI/mg.

3. Mezclas según la reivindicación 1 ó 2 **caracterizadas** porque la actividad anti Xa está comprendida entre 140 y 150 UI/mg y el peso molecular medio está comprendido entre 2.000 y 3.000 dalton.

4. Mezclas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en forma de sal de sodio, de potasio, de calcio o de magnesio.

5. Mezclas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que tienen una actividad anti-IIa de 0 a 5 UI/mg.

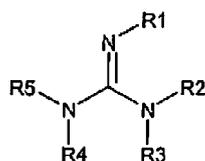
6. Mezclas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que presentan una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 25.

7. Procedimiento de preparación de las mezclas de la reivindicación 1, **caracterizado** porque:

- se despolimeriza una sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina en medio orgánico, mediante:
  - o una base orgánica fuerte de pka superior a 20 elegida entre 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafosforina, las bases de la familia de la guanidina y los fosfacenos,
  - o imidazolato de sodio,
- se transforma la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada en sal de sodio,
- se saponifica el éster y opcionalmente se purifica el producto.

8. Procedimiento según la reivindicación 7 para el que la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina es la sal de bencetonio, de cetilpiridinio o de cetiltrimetilamonio.

9. Procedimiento según la reivindicación 7 para el que las bases de la familia de las guanidinas son las de fórmula:



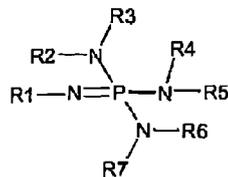
en la que R<sub>1</sub> es hidrógeno o alquilo, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> idénticos o diferentes representan cada uno un radical alquilo, teniendo los radicales alquilo 1 a 6 átomos de carbono en cadena recta o ramificada.

## ES 2 347 134 T3

10. Procedimiento según la reivindicación 9 para el que  $R_1$  es hidrógeno y  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  son radicales metilo.

11. Procedimiento según la reivindicación 7 para el que las bases de la familia de los fosfacenos son las de fórmula:

5



10

15 en la que los radicales  $R_1$  a  $R_7$  son idénticos o diferentes y representan los radicales alquilo que contienen 1 a 6 átomos de carbono, en cadena recta o ramificada.

20 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 11 para el que la relación en mol base orgánica fuerte de pKa superior a 20 o imidazolato de sodio/sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina está comprendida entre 0,2 y 5.

25 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 12 para el que la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina tiene una tasa de esterificación comprendida entre 50 y 100%.

30 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 13 para el que la transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada en sal de sodio se efectúa por tratamiento del medio de reacción con una disolución alcohólica de acetato de sodio.

35 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 14 para el que la saponificación se efectúa mediante un hidróxido de metal alcalino.

40 16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 15 para el que la purificación se efectúa mediante peróxido de hidrógeno.

45 17. Mezclas tales como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como medicamentos.

50 18. Mezclas tales como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como medicamentos antitrombóticos.

55 19. Composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo una mezcla según una de las reivindicaciones 1 a 6.

60

65

70

75

80