(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 383 597**

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **03807882 .0**
(96) Fecha de presentación: **08.10.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1556414**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

(54) Título: **Mezclas de oligosacáridos derivados de heparina, su preparación y las composiciones farmacéuticas que las contienen**

(30) Prioridad:
10.10.2002 FR 0212584

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2012

(73) Titular/es:
AVENTIS PHARMA S.A.
20, AVENUE RAYMOND ARON
92160 ANTONY, FR

(72) Inventor/es:
BIBEROVIC, Vesna;
GRONDARD, Luc;
MOURIER, Pierre y
VISKOV, Christian

(74) Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 383 597 T3

DESCRIPCIÓN

Mezclas de oligosacáridos derivados de heparina, su preparación y las composiciones farmacéuticas que las contienen

La presente invención se refiere a mezclas de oligosacáridos 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 presentan todavía una actividad anti-IIa importante.

Se han descrito igualmente heparinas de muy bajo peso molecular en el documento de patente US6384021. Sin embargo, los valores de actividad anti-Xa obtenidos en los ejemplos descritos no sobrepasan los 120 UI, y la relación anti-Xa/anti-IIa obtenida está comprendida entre 15 y 50.

En el documento WO-0208295, se preparan heparinas de muy bajo peso molecular por un procedimiento diferente del documento US6384021 y que presentan una actividad comprendida entre 100 y 150 UI con relaciones anti-Xa/anti-IIa igualmente muy elevadas para algunos ejemplos de aplicación.

La solicitud de Patente Europea EP-A-027089 divulga fracciones de oligosacáridos que poseen una actividad anti-Xa superior a la de la heparina no fraccionada.

Existe sin embargo una necesidad constante en de esta clase de medicamentos de mejorar las actividades anti-Xa, particularmente obteniendo actividades superiores a 150 UI/mg, así como la relación anti-Xa/anti-IIa, y por lo tanto de poner a punto nuevas generaciones de derivados de heparinas.

Uno de los objetivos de la invención es por lo tanto mejorar la actividad anti-Xa y la relación anti-Xa/anti-IIa modificando los procedimientos descritos en la técnica anterior, particularmente controlando el porcentaje de agua en la etapa de despolimerización. Las heparinas así obtenidas presentan de ese modo una excelente actividad antitrombótica y poseen una actividad aXa próxima a la de la heparina, disminuyendo los riesgos de hemorragia con una actividad aIIa muy débil. Igualmente, los productos de la invención presentas duraciones de semi-vida muy superiores a las de la heparina.

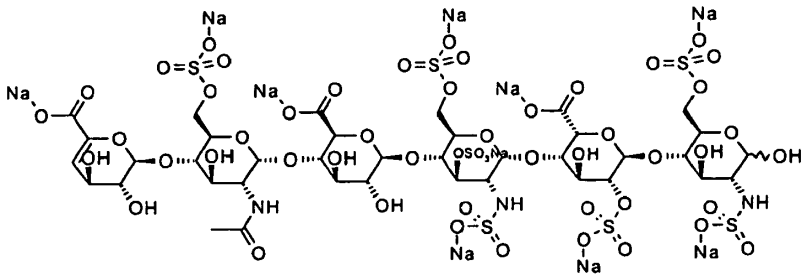
La invención tiene por objeto nuevas mezclas de oligosacáridos derivados de heparina que poseen una actividad más selectiva frente al factor X activado (factor Xa) y el factor II activado (factor IIa) que la heparina.

Se entiende que las mezclas de polisacáridos que tienen un peso molecular medio de 1500 a 3000 Da pueden calificarse de oligosacáridos.

La presente invención tiene por lo tanto por objeto las mezclas de oligosacáridos sulfatados que poseen la estructura general de los polisacáridos constitutivos de la heparina y que presentan las características siguientes:

- tienen un peso molecular medio de 2000 a 3000 dalton, una actividad anti-Xa > 150 UI/mg y < 200 UI/mg, una actividad anti-IIa inferior a 10 UI/mg y una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 30,

- los oligosacáridos constitutivos de las mezclas contienen de 2 a 26 restos sacarídicos, tienen un resto ácido urónico-4,5 insaturado 2-O-sulfatado en uno de sus extremos, contienen una fracción hexasacárida que representa de 15 a 25 % de las mezclas de oligosacáridos, y contienen de 8 a 15 % del hexasacárido ΔIIa-IIs-Is en la fracción hexasacárida :



ΔIIa IIs Is

El hexasacárido ΔIIa-IIs-Is contenido en la mezcla de oligosacáridos descrita en la presente invención es una secuencia fuertemente afín a ATIII y se caracteriza por una actividad aXa superior a 740 UI/mg.

La mezcla de oligosacáridos descrita en la presente invención está en forma de una sal de metal alcalino o alcalinotérreo.

Como 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.

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.

La fracción hexasacárida representa de 15 a 25 % de la mezcla de oligosacáridos.

Las mezclas según la invención contienen de 8 a 15% del hexasacárido ΔIIa-IIs-Is en la fracción hexasacárida de la mezcla de oligosacáridos.

El porcentaje de la fracción hexasacárida puede determinarse de forma analítica por cromatografía líquida de alta presión en columnas TSK G3000 XL y TSK G2000 XL o bien por separación preparativa de la fracción hexasacárida. La mezcla en este caso se cromatografía sobre columnas rellenas de gel de tipo poliacrilamida agarosa tal como la comercializada con la marca Ultrogel ACA202^{R} (Biosepra). La mezcla se eluye con una disolución de hidrógenocarbonato de sodio. Preferentemente, la disolución de hidrógenocarbonato de sodio es una disolución de 0,1 mol/l a 1 mol/l. Aún más preferentemente, la separación se realiza a una concentración de 1 mol/l. La detección se realiza por espectrometría UV (254nm). Después del fraccionamiento, la fracción hexasacárida en disolución en hidrógenocarbonato de sodio se neutraliza con ácido acético glacial. La disolución se concentra bajo presión reducida de forma que se obtiene una concentración de acetato de sodio superior a 30% en peso. La fracción de hexasacárido se precipita por adición de 3 a 5 volúmenes de metanol. La fracción de hexasacáridos se recupera por filtración sobre vidrio sinterizado n°3. La mezcla de hexasacáridos obtenida puede analizarse por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) para determinar el contenido en hexasacárido ΔIIa-IIs-Is. El hexasacárido ΔIIa-IIs-Is puede aislarse por cromatografía HPLC preparativa o por cromatografía de afinidad en columna antitrombina III sefarosa según las técnicas utilizadas por el experto en la técnica (M. Hook, I. Bjork, J. Hopwood y U. Lindahl, F.E B.S letters, vol 656(1) (1976)).

De preferencia, las mezclas según la invención tienen una actividad anti-IIa inferior a 5 UI/mg, y más particularmente de 0,5 a 3,5 UI/mg. Los ejemplos de aplicaciones descritos más abajo ponen en evidencia valores comprendidos entre 1,1 y 1,6 UI/mg cuando se realizan las características preferidas del procedimiento.

De preferencia, las mezclas presentan una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 50 y más particularmente superior a 100.

De preferencia, las mezclas según la invención tienen un peso molecular medio comprendido entre 2400 y 2650 Da.

La invención tiene por lo tanto particularmente por objeto las mezclas tal como se definen anteriormente que presentan una actividad anti-Xa > 150 UI/mg y < 200 UI/mg, una actividad anti-IIa comprendida entre 0,5 y 3,5 UI/mg y un peso molecular medio comprendido entre 2400 y 2650 Da.

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, por medio de una base orgánica fuerte de pKa superior a 20 (propiedades de preferencia emparentadas con la familia de los fosfazenos definidas 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)), transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada en sal de sodio, saponificación de los ésteres residuales y opcionalmente purificación. Le procedimiento según la invención recoge las grandes etapas del procedimiento tal como se describe en el documento W0 0208295 añadiendo una característica esencial que permite obtener las mezclas de oligosacáridos según la invención con las características físico-químicas y las actividades descritas anteriormente.

En efecto, para obtener las mezclas de oligosacáridos específica según la invención, es necesario controlar la selectividad de la base mediante un control muy preciso del contenido de agua durante la etapa de despolimerización.

El procedimiento según la presente invención está en efecto caracterizado por un control de la fuerte selectividad de la base durante la despolimerización. Permite despolimerizar la heparina preservando al máximo las secuencias afines a la ATIII tal como el hexasacárido ΔIIa-IIs-Is descrito en la presente invención. Esta etapa crítica del procedimiento permite obtener las mezclas de oligosacáridos según la invención.

Esta característica del procedimiento se traduce en actividades aXa inesperadas con relación al peso molecular medio de las mezclas de oligosacáridos (150 UI/mg < aXa < 200 UI/mg para un peso molecular medio comprendido entre 2000 Da y 3000 Da). Esta selectividad es debida a las características físico-químicas muy particulares de las bases fosfazeno que presentan un pKa superior a 20, un impedimento estérico muy fuerte y una nucleofilia muy baja.

Este efecto se expresa plenamente cuando el medio de reacción es anhidro. Por contra, cuando el contenido de agua del medio de reacción aumenta, se observa una disminución drástica de la selectividad de la despolimerización. La conservación de las secuencias afines a ATIII disminuye y la consecuencia es una caída importante de la actividad aXa. En presencia de una cantidad de agua baja, la base fosfazeno se protona y la especie reactiva se transforma en hidróxido de amonio cuaternario. En este caso, se pierden las propiedades de impedimento estérico muy fuerte y nucleofilia baja e influyen enormemente sobre la calidad del producto obtenido. Cuando se realizan ensayos de despolimerización con un contenido de agua medido y controlado, se puede ver este efecto expresarse plenamente.

La siguiente tabla resume el impacto del contenido de agua sobre la selectividad de la despolimerización (solo este parámetro es variable en los ensayos : las estequiometrías de los reactivos, las diluciones, las temperaturas permanecen constantes según los criterios del experto en la materia. La base utilizada es la base fosfazeno : 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3 dimetilperhidro-1,2,3-diaza-fosforina).

Contenido de agua %	0,05%	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	0,57%	1,8%	2,5%
aXa UI/mg	192	177	161	132	122	120	105	99
aIIa UI/mg	1,3	1,5	1,4	1,4	1,3	1,4	3,1	13,4
aXa/aIIa	148	118	115	94	94	85,7	34	7,4

Para una selectividad óptima y una conservación máxima de secuencias afines a ATIII, es preferible operar con contenidos en agua inferiores a 0,3% cuando se trabaja con 1 equivalente molar de base fosfazeno respecto al éster bencílico de la heparina, sal de bencetonio.

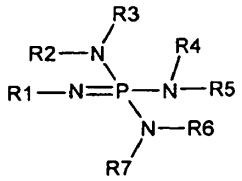
La invención tiene por lo tanto más particularmente por objeto la etapa de despolimerización de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina obtenida según los métodos conocidos del experto en la materia caracterizada por que se utiliza una base de la familia de los fosfazenos, particularmente en disolución en diclorometano, que contiene un porcentaje de agua inferior a 0,3 % y más particularmente inferior a 0,2 %.

Ventajosamente, la relación el moles de base fuerte/éster está comprendida entre 0,2 y 5, de preferencia entre 0,6 y 2 y más particularmente entre 0,8 y 1,2. La utilización de la relación equimolecular forma parte, por lo tanto, de los modos de ejecución preferidos de la invención.

Se pueden utilizar otros disolventes apróticos conocidos del experto en la materia tales como el THF o el DMF.

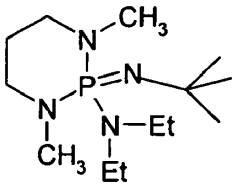
La sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina es preferentemente la sal de bencetonio, de cetilpiridinio o de cetiltrimetilamonio.

Las bases de la familia de los fosfazenos son, preferentemente, las de fórmula:



en la que los radicales R1 a R7 son idénticos o diferentes y representan radicales alquilo.

En particular la invención tiene por objeto el procedimiento tal como se define más arriba caracterizado por que la base utilizada en la etapa d) de despolimerización) es la 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diaza-fosforina (1,3,2-diazafosforin-2-amina, 2-[(1,1-dimetiletil)imino]-N,N-dietil-1,2,2,2,3,5,6-octahidro-1,3-dimetilo) :



o el terc-butilimino-tri(pirrolidino)-fosforano.

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

La invención tiene por lo tanto por objeto un procedimiento de preparación de mezclas de oligosacáridos según la invención que comprende las etapas siguientes :

a) Transalificación de la heparina de sodio por acción de cloruro de bencetonio,

b) Esterificación del heparinato de bencetonio por acción de cloruro de bencilo,

c) Transalificación del éster bencílico obtenido en sal de amonio cuaternario,

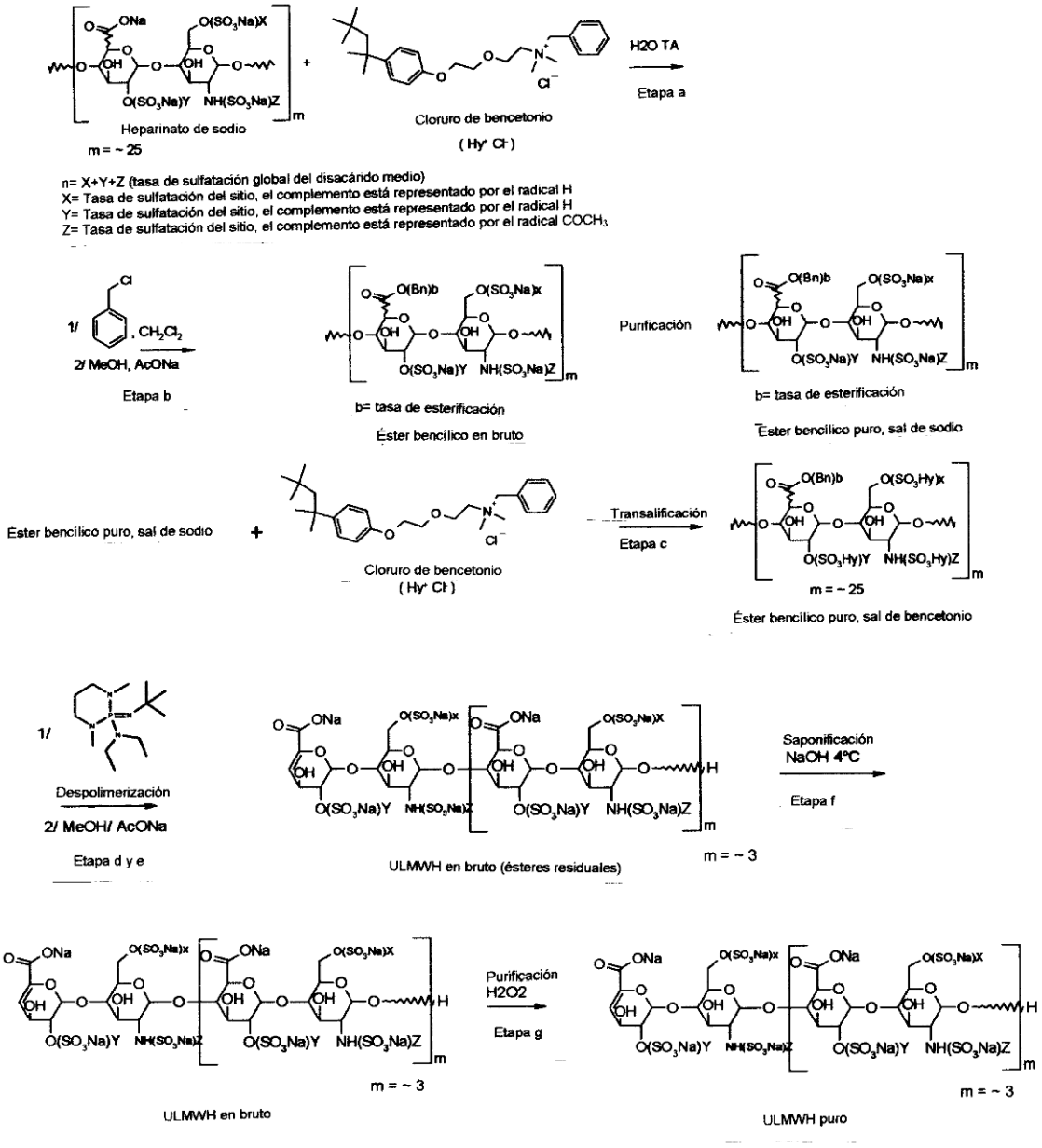
d) Despolimerización de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina por el método tal como se define más arriba,

e) Transformación de la sal de amonio cuaternario en sal de sodio,

f) Opcionalmente saponificación de la heparina por acción de una base tal como la sosa

g) Opcionalmente purificación particularmente por acción de un agente de oxidación tal como el agua oxigenada.

El esquema de reacción siguiente ilustra la presente invención:



La transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada en sal de sodio (etapa e) 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 (etapa f) 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, 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 1 a 2 equivalentes molares de hidróxido de metal alcalino.

El producto final puede purificarse (etapa g) opcionalmente por cualquier método conocido de purificación de las heparinas despolimerizadas (por ejemplo EP 0037319B1). 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 (Transalificación),

b) esterificación de la sal de bencetonio obtenida anteriormente mediante cloruro de bencilo y después 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 preferentemente por acción del cloruro de bencetonio en exceso sobre la heparina sódica, a una temperatura cercana a 15 a 25°C. De manera ventajosa, la relación molar sal/heparina sódica está comprendida entre 3 y 4.

La heparina de partida utilizada es de preferencia una heparina de cerdo. Ésta puede purificarse previamente para disminuir su tasa de sulfato de dermatán 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 bencetonio se recupera a continuación en forma de sal de sodio por precipitación en el medio de acetato de sodio al 10 % en peso 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 h.

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 cetiltrimetil amonio, 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 FR 73 13 580.

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

Las mezclas de oligosacáridos de la presente invención pueden utilizarse como agentes antitrombóticos. En particular, son útiles para el tratamiento o la prevención de las trombosis venosas y arteriales, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, angina inestable, infarto de miocardio, isquemia cardiaca, enfermedades oclusivas de las arterias periféricas y fibrilación auricular. Son igualmente útiles en la prevención y el tratamiento de la proliferación de las células musculares lisas aterosclerosis y arteriosclerosis, para el tratamiento y la prevención del cáncer por la modulación de la angiogénesis y los factores de crecimiento, y para el tratamiento y la prevención de los trastornos diabéticos tales como las retinopatías y las nefropatías diabéticas.

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

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

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, no obstante, sin limitarla.

Ejemplo A : PREPARACIÓN DE HEPARINATO DE BENCILO SAL DE BENCETONIO

Heparinato de bencetonio

A una disolución de 10 g de heparina de sodio en 100 ml de agua, 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.

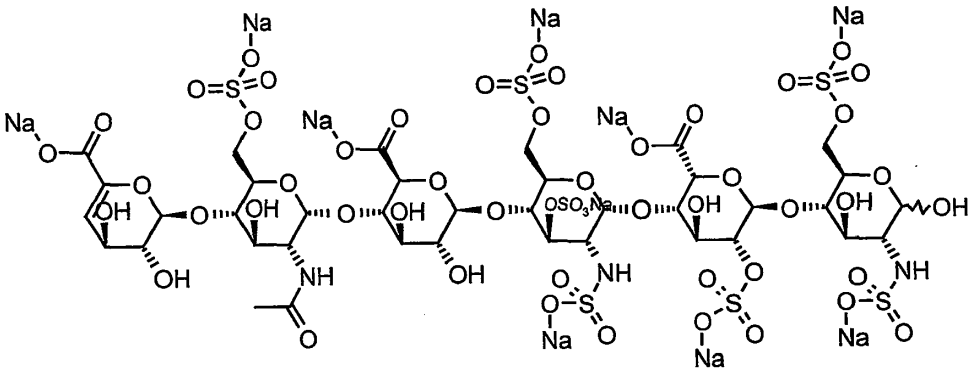
Éster bencílico de heparina (sal de sodio)

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 la 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. Transcurrido este tiempo, se extrae y se descarta la parte límpida del sobrenadante. 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 heparinato de bencilo, sal de bencetonio. El rendimiento obtenido es 94,9%.

Ejemplo B : DESCRIPCIÓN DEL HEXASACÁRIDO ATIII (ΔIIa-IIs-Is)



Espectro protón en D_2O, 500 MHz, T=298 K, δ en ppm : 1,97 (3H, s), 3,18 (1H, dd, 10 et 3Hz), 3,30 (1H, t, 8Hz), 3,37 (1H, dd, 10 et 3Hz), 3,60 (2H, m), entre 3,65 y 3,85 (6H, m), 3,87 (2H, m), 3,95 (1H, d, 8Hz), 4,03 (1H, d, 8Hz), entre 4,05 y 4,13 (4H, m), entre 4,16 y 4,45 (8H, m), 4,52 (1H, d, 8Hz), 4,67 (1H, m), 5,06 (1H, d, 6Hz), 5, 10 (1H, d, 3Hz), 5,33 (1H, d, 4Hz), 5,36 (1H, d, 3Hz), 5,46 (1H, d, 3Hz), 5,72 (1H, d, 4Hz).

Sal de decasodio del ácido 4-desoxi -α-L-treo-hexenepiranosilurónico-(1→ 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)-ácido P-D-glucopiranosilurónico-(1→4)-2-desoxi-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo-α-D-glucopiranosil)-(1→4)-ácido 2-O-sulfo-α-Z-idopirano-silurónico-(1→4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo-α-D-glucopiranosa.

- Los ejemplos 1 a 7 y 12 ilustran la influencia del contenido de agua sobre la selectividad de la reacción de polimerización y la actividad aXa y aIIa de los productos obtenidos.

- Los ejemplos 8 a 10 ilustran la influencia del número de equivalentes de base sobre la actividad aXa y aIIa del producto obtenido (con un contenido de agua de 0,1%)

- El ejemplo 11 ilustra la utilización de otra base fosfazeno diferente de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diaza-fosforina :

Utilización de terc-butilimino tri(pirrolidino) fosforano

EJEMPLO 1

Despolimerización y transformación en sal de sodio (0,1 % de agua) :

En un erlenmeyer A, se introducen 70 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 10 g (0,006 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. El contenido de agua del medio de reacción se ajusta a 0,1 %. La disolución se calienta a 40°C con nitrógeno. Después de completada la disolución, se vuelve a una temperatura próxima a 20°C, después se añaden 1,75 ml (0,006 mol) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diaza-fosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 30 g de acetato de sodio anhidro en 300 ml de metanol. Después de disolución completa, se añade a la disolución 5 g de celita Hyflo supercel. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en 1 minuto 30 segundos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 5°C. Después de 5 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante una hora 30 minutos. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (220 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 220 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 1 hora 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (250 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 250 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 100 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 2,51 g de la sal de sodio de la heparina despolimerizada en la celita (5 g). El rendimiento obtenido es 64%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 2,5 g (0,0038 moles) de la heparina despolimerizada bruta, sal de sodio en la celita (5 g) obtenida anteriormente y 17 ml de agua. La suspensión se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 2 veces con 5 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 150 ml. Con agitación magnética, se introducen 0,4 ml (0,004 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 5°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 3 g de cloruro de sodio. Después de disolución se añaden al medio de reacción 21 ml de metanol. Después de 15 minutos de agitación se añaden 44 ml de metanol, después se agita durante una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 45 minutos a una temperatura cercana a 5°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (90 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 90 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (80 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 80 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 1,31 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 66%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 1,3 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 13 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,7 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,07 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 2 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra a continuación sobre membrana de 45 µm, después se vierten 14 ml de metanol. La disolución se enfría a continuación a 10°C y se agita durante aproximadamente 15 minutos. Se añaden entonces 36 ml de metanol y a continuación se agita una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante aproximadamente 15 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 25 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 1,13 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es de 87 %. Las características de la heparina despolimerizada así obtenida son las siguientes :

Peso molecular medio: 2600 Daltons

Actividad anti-Xa: 177 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1,5 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 118

<u>EJEMPLO 2</u>

Despolimerización y transformación en sal de sodio (0,2 %)

En un erlenmeyer A, se introducen 70 ml de diclorometano. Con agitación y bajo presión de nitrógeno, se cargan lentamente 10 g (0,006 mol) de éster bencílico de heparina (nivel de esterificación : 75%, sal de bencetonio)

obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. El contenido de agua del medio de reacción se ajusta a 0,2 %. Después de la disolución completa, se añaden 1,75 ml (0,006 moles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 30 g de acetato de sodio anhidro en 300 ml de metanol. Después de disolución completa, se añade a la disolución 5 g de celita Hyflo supercel. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en 1 minuto 30 segundos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 5°C. Después de 5 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante 2 horas. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (220 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 220 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 2 horas aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (230 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 230 ml de metanol. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 150 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 2,63 g de la heparina despolimerizada bruta en la celita (5 g). El rendimiento obtenido es 67%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 2,5 g (0,0038 moles) de la heparina despolimerizada, sal de sodio en la celita (5 g) obtenida anteriormente y 18 ml de agua. La suspensión se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 2 veces con 5 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 150 ml. Con agitación magnética, se introducen 0,4 ml (0,004 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 5°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 2 g de cloruro de sodio. Se vierten 14 ml de metanol en la mezcla de reacción. Después de 15 minutos de agitación se añaden 36 ml de metanol, después se agita durante una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 45 minutos a una temperatura cercana a 5°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (80 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 80 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 48 horas de secado, se obtienen 2,3 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 65%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 1,4 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 1N, se lleva el pH a 9,7 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,07 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 40°C, la mezcla se enfría a una temperatura cercana a 20°C, a continuación se neutraliza por adición de HCl 1N. Se añaden al medio de reacción 2 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra a continuación sobre membrana de 45 µm, después se vierten 14 ml de metanol. La disolución se enfría después a 10°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 36 ml de metanol y a continuación se agita una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 15 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (40 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla), se añaden 40 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 1,2 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 86%.

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

Peso molecular medio: 2650 Daltons

Actividad anti-Xa: 161 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1,4 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 115

<u>EJEMPLO de referencia 3</u>:

Despolimerización y transformación en sal de sodio (0,3 % de agua) :

En un erlenmeyer A, se introducen 70 ml de diclorometano. Con agitación y bajo presión de nitrógeno, se cargan 10 g (0,006 mol) de éster bencílico de heparina (nivel de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. El contenido de agua del medio de reacción se ajusta a 0,3 %. Después de la disolución completa, se añaden 1,75 ml (0,006 moles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 30 g de acetato de sodio anhidro en 300 ml de metanol. Después de disolución

completa, se añade a la disolución 5 g de celita Hyflo supercel. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en 1 minuto 30 segundos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 5°C. Después de 5 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante 1 hora 10 minutos. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (220 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 220 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 100 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 2,57 g de la sal de sodio de la heparina despolimerizada bruta en la celita (5 g). El rendimiento obtenido es 66%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 2,5 g (0,0038 moles) de la heparina despolimerizada bruta, sal de sodio en la celita (5 g) obtenida anteriormente y 18 ml de agua. La suspensión se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 2 veces con 5 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 150 ml. Con agitación magnética, se introducen 0,4 ml (0,004 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 5°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 3 g de cloruro de sodio. Se vierten 15 ml de metanol en la mezcla de reacción. Después de 15 minutos de agitación se añaden 36 ml de metanol, después se agita durante una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 1 hora. El sobrenadante se recoge y se desecha (70 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 70 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 48 horas de secado, se obtienen 1,42 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 62%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 1,4 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 14 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,7 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,07 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 2 g de cloruro de sodio. Después de disolverse, la disolución se filtra a continuación sobre una membrana de 45 µm, después se vierten 14 ml de metanol. El filtrado se enfría a continuación a 10°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 36 ml de metanol y a continuación se agita aproximadamente una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 40 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla), se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 25 minutos aproximadamente. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 1,24 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 89%.

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

Peso molecular medio: 2.400 Daltons

Actividad anti-Xa: 132 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1,4 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 94

<u>EJEMPLO de referencia 4</u>:

Despolimerización y transformación en sal de sodio (0,4 % de agua) :

En un erlenmeyer A, se introducen 70 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 10 g (0,006 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. El contenido de agua del medio de reacción se ajusta a 0,4 %. La disolución se calienta a 30°C con nitrógeno. Después de completada la disolución, se vuelve a una temperatura próxima a 20°C, después se añaden 1,75 ml (0,006 mol) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diaza-fosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 30 g de acetato de sodio anhidro en 300 ml de metanol. Después de disolución completa, se añade a la disolución 5 g de celita Hyflo supercel. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en aproximadamente 1 minuto 30 segundos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 5°C. Después de 5 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante 2 horas. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (80 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 80 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 1 hora aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (80 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 80 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El

precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 150 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 3,25 g de la sal de sodio de la heparina despolimerizada bruta en la celita (5 g). El rendimiento obtenido es 83%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 3,1 g (0,0018 moles) de la heparina despolimerizada bruta, sal de sodio en la celita (10 g) obtenida anteriormente y 21 ml de agua. La suspensión se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 2 veces con 6 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 150 ml. Con agitación magnética, se introducen 0,7 ml (0,007 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 5°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 4 g de cloruro de sodio. Se vierten 28 ml de metanol en la mezcla de reacción. Después de 15 minutos de agitación se añaden 72 ml de metanol, después se agita durante una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 1 hora. El sobrenadante se recoge y se desecha (90 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 90 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (90 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 90 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 48 horas de secado, se obtienen 1,9 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 67%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 1,9 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 19 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,7 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,1 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 2 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra a continuación sobre una membrana de 0,45 µm, después se vierten 14 ml de metanol y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 36 ml de metanol y a continuación se agita una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 15 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (40 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 40 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 500 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 20 minutos aproximadamente. La suspensión se filtra a continuación sobre vidrio fritado 3. La torta blanca obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 72 horas de secado, se obtienen 1,56 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 82%.

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

Peso molecular medio: 2350 Daltons

Actividad anti-Xa: 122 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1.3 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 94

EJEMPLO de referencia 5:

Despolimerización y transformación en sal de sodio (0,57 % de agua) :

En un erlenmeyer A, se introducen 140 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 20 g (0,019 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. El contenido de agua del medio de reacción se ajusta a 0,57 %. Después de la disolución completa, se añaden 3,5 ml (0,012 moles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 60 g de acetato de sodio anhidro en 600 ml de metanol. Después de disolución completa, se añade a la disolución 10 g de celita Hyflo supercel. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en 1 minuto 30 segundos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 4°C. Después de 5 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante 30 minutos. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (400 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 400 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 1 hora aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (420 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 420 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. La suspensión se filtra a continuación sobre vidrio fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 200 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una

temperatura cercana a 50°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 6,66 g de la sal de sodio de la heparina despolimerizada bruta en la celita (10 g). El rendimiento obtenido es 85%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 6,66 g (0,0101 moles) de la heparina despolimerizada bruta, sal de sodio en la celita (10 g) obtenida anteriormente y 47 ml de agua. La suspensión se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 2 veces con 15 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 150 ml. Con agitación magnética, se introducen 1,1 ml (0,011 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 5°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 9,5 g de cloruro de sodio. Se añaden al medio de reacción 66 ml de metanol. Después de 15 minutos de agitación se añaden 171 ml de metanol, después se agita durante una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 3/4 de hora a una temperatura cercana a 5°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (160 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 160 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (180 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 180 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. La suspensión se filtra a continuación sobre vidrio fritado 3. La torta obtenida se lava 2 veces con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 4,53 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 74%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 100 ml, se introducen 4,53 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 45 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,7 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,25 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 5,5 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra después sobre una membrana de 0,45 µm, a continuación se vierten 38 ml de metanol a una temperatura cercana a 10°C. La disolución se lleva después a 20°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 100 ml de metanol y a continuación se agita una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 20 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (90 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 90 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 25 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (100 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 3,7 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 82%. Las características de la heparina despolimerizada así obtenida son las siguientes :

Peso molecular medio: 2200 Daltons

Actividad anti-Xa: 120 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1.4 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 86

<u>EJEMPLO de referencia 6</u>:

Despolimerización y transformación en sal de sodio (1,8 % de agua) :

En un erlenmeyer A, se introducen 140 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 20 g (0,019 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. El contenido de agua del medio de reacción se ajusta a 1,8 %. Después de la disolución completa, se añaden 3,5 ml (0,012 moles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 60 g de acetato de sodio anhidro en 600 ml de metanol. Después de disolución completa, se añade a la disolución 10 g de celita Hyflo supercel. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en 1 minuto 30 segundos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 4°C. Después de 5 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante 30 minutos. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (400 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 400 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 1 hora aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (420 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 420 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 200 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 7,54 g de la sal de sodio de la heparina despolimerizada bruta en la celita (10 g). El rendimiento obtenido es 96%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 7,54 g (0,0101 moles) de la heparina despolimerizada bruta, sal de sodio en la celita (10 g) obtenida anteriormente y 53 ml de agua. La disolución se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 2 veces con 15 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 150 ml. Con agitación magnética, se introducen 1,25 ml (0,012 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 4°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 10,5 g de cloruro de sodio. Se añaden al medio de reacción 70 ml de metanol. Después de 15 minutos de agitación se añaden 190 ml de metanol, después se agita durante una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 3/4 de hora a una temperatura cercana a 4°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (180 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 180 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (180 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 180 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava 2 veces con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 5,53 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 80%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 100 ml, se introducen 5,53 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 55 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,7 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,31 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 7 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra después sobre una membrana de 0,45 µm, a continuación se vierten 49 ml de metanol a una temperatura cercana a 10°C. La disolución se lleva después a 20°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 126 ml de metanol y a continuación se agita una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 20 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (105 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 105 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 25 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (110 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 55°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 4,53 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 82%.

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

Peso molecular medio: 2600 Daltons

Actividad anti-Xa: 105 UI/mg

Actividad anti-IIa: 3.1 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 34

<u>EJEMPLO</u> de referencia 7:

Despolimerización y transformación en sal de sodio (2,5 % de agua) :

En un erlenmeyer A, se introducen 140 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 20 g (0,019 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. El contenido de agua del medio de reacción se ajusta a 2,5 %. Después de la disolución completa, se añaden 3,5 ml (0,012 moles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 60 g de acetato de sodio anhidro en 600 ml de metanol. Después de disolución completa, se añade a la disolución 10 g de celita Hyflo supercel. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en 1 minuto 30 segundos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 4°C. Después de 5 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante 1 hora. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (400 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 400 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (400 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 200 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 7,78 g de la sal de sodio de la heparina despolimerizada bruta en la celita (10 g). El rendimiento obtenido es 99,6%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 7,78 g (0,0119 moles) de la heparina despolimerizada bruta, sal de sodio en la celita (10 g) obtenida anteriormente y 79 ml de agua. La suspensión se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 2 veces con 15 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 150 ml. Con agitación magnética, se introducen 1,3 ml (0,012 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 4°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 10 g de cloruro de sodio. Se añaden al medio de reacción 60 ml de metanol. Después de 15 minutos de agitación se añaden 190 ml de metanol, después se agita durante una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 3/4 de hora a una temperatura cercana a 4°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (180 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 180 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (180 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 180 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava 2 veces con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 5,87 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 82%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 100 ml, se introducen 5,87 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 59 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,7 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,34 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 7 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra después sobre una membrana de 0,45 µm, a continuación se vierten 49 ml de metanol a una temperatura cercana a 10°C. La disolución se lleva después a 20°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 126 ml de metanol y a continuación se agita una hora. La agitación se detiene y se deja sedimentar la suspensión durante 20 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (105 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 105 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 25 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (110 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 55°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 5,21 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 89%.

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

Peso molecular medio: 3550 Daltons

Actividad anti-Xa: 99 UI/mg

Actividad anti-IIa: 13,4 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 7,4

EJEMPLO de referencia 8:

Despolimerización y transformación en sal de sodio (0,5 equivalentes de base) :

En un erlenmeyer A, se introducen 140 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 20 g (0,019 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Después de disolución completa a una temperatura cercana a 30°C y vuelta a una temperatura cercana a 20°C, se añaden 1,75 ml (0,006 mol) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 60 g de acetato de sodio anhidro en 600 ml de metanol. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 4°C. Después de 1 hora de agitación se deja decantar la suspensión durante 2 horas. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (420 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 420 ml de metanol y se agita durante 30 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 18 horas aproximadamente. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (400 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 400 ml de metanol y se agita durante 30 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (400 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava 2 veces con 100 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 60°C. Después de secado, se obtienen 5,7 g de heparina despolimerizada bruta, sal de sodio. El rendimiento obtenido es 73%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 100 ml, se introducen 5,7 g (0,0086 moles) de la heparina despolimerizada bruta, sal de sodio obtenida anteriormente y 53 ml de agua. Con agitación magnética, se introducen 0,93 ml (0,009 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 4°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 6 g de cloruro de sodio. Se añaden al medio de reacción 42 ml de metanol. Después de 15 minutos de agitación se añaden 108 ml de metanol, después se agita durante 30 minutos. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 30 minutos a una temperatura cercana a 4°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (180 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 180 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (170 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 170 ml de metanol y se agita durante 30 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava 2 veces con 30 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida, a una temperatura cercana a 60°C. Después de secado, se obtienen 3,5 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 67,4%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 100 ml, se introducen 3,5 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 35 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,6 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,18 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 3,6 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra después sobre una membrana de 0,45 µm, a continuación se vierten 27 ml de metanol a una temperatura cercana a 10°C. La disolución se lleva después a 20°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 65 ml de metanol y a continuación se agita 30 minutos. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 30 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (80 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 80 ml de metanol y se agita durante 30 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 70 ml de metanol y se agita durante 30 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava 2 veces con 30 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida, a una temperatura cercana a 60°C. Después de secado, se obtienen 2,8 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 80%.

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

Peso molecular medio: 2.900 Daltons

Actividad anti-Xa: 146,1 UI/mg

Actividad anti-IIa: 5,1 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 28,6

EJEMPLO 9

Despolimerización y transformación en sal de sodio (0,6 equivalentes de base) :

En un matraz de tres bocas A, se introducen 280 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 40 g (0,024 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Después de disolución completa a una temperatura cercana a 30°C y vuelta a una temperatura cercana a 20°C, se añaden 4,2 ml (0,014 mol) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 60 g de acetato de sodio anhidro en 600 ml de metanol. Con agitación magnética, la mitad de la mezcla de reacción del matraz de tres bocas A se vierte en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 4°C. Después de 1 hora de agitación se deja decantar la suspensión. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (310 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 310 ml de metanol y se agita durante 1 hora. Se deja re-sedimentar el precipitado 18 horas aproximadamente. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (400 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 400 ml de metanol y se agita durante 1 hora. El sobrenadante se recoge y se desecha (300 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava 2 veces con 100 ml de metanol. El sólido húmedo amarillo claro se filtra con succión y se seca bajo presión reducida, a una temperatura cercana a 60°C. Después de secado, se obtienen 6 g de heparina despolimerizada bruta, sal de sodio. El rendimiento obtenido es 77%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 250 ml, se introducen 6 g (0,0091 moles) de la heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) obtenida anteriormente y 56 ml de agua. Con agitación magnética, se introducen 1 ml (0,010 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 4°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 6,4 g de cloruro de sodio. Se añaden al medio de reacción 45 ml de metanol. Después de 15 minutos de agitación se añaden 115 ml de metanol, después se agita durante 30 minutos. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 30 minutos a una temperatura cercana a 4°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (170 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 170 ml de metanol y se agita durante 30 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (140 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 140 ml de metanol y se agita durante 30 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava 2 veces con 30 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida, a una temperatura cercana a 60°C. Después de secado, se obtienen 3,6 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 65,3%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 100 ml, se introducen 3,5 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 35 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,6 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,18 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 3,5 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra después sobre una membrana de 0,45 µm, a continuación se vierten 25 ml de metanol a una temperatura cercana a 10°C. La disolución se lleva después a 20°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 63 ml de metanol y a continuación se agita 30 minutos. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 30 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (70 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 70 ml de metanol y se agita durante 30 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado algunos minutos. La suspensión se filtra a continuación sobre vidrio fritado 3. La torta blanca obtenida se lava 2 veces con 30 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida, a una temperatura cercana a 60°C. Después de secado, se obtienen 2,5 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 71,4%.

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

Peso molecular medio: 2600 Daltons

Actividad anti-Xa: 150,5 UI/mg

Actividad anti-IIa: 3,2 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 47

EJEMPLO 10

Despolimerización y transformación en sal de sodio (0,8 equivalentes de base) :

En un erlenmeyer A, se introducen 70 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 10 g (0,006 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Después de disolución completa a una temperatura cercana a 30°C y vuelta a una temperatura cercana a 20°C, se añaden 1,38 ml (0,004 mol) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 30 g de acetato de sodio anhidro en 300 ml de metanol. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en 1 minuto 15 segundos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 4°C. Después de 5 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante 1 hora. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (190 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 190 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (190 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 190 ml de metanol y se agita durante 30 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (190 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 150 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 3,05 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 80%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 100 ml, se introducen 3,05 g (0,0048 moles) de la heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) obtenida anteriormente y 21 ml de agua. La disolución se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 2 veces con 6 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 150 ml. Con agitación magnética, se introducen

0,6 ml (0,006 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 4°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 4 g de cloruro de sodio. Se añaden al medio de reacción 28 ml de metanol. Después de 15 minutos de agitación se añaden 72 ml de metanol, después se agita durante 1 hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 30 minutos a una temperatura cercana a 4°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (80 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 80 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (80 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 80 ml de metanol y se agita durante 30 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de secado, se obtienen 1,6 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 57%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 1,6 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 16 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,6 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,08 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 2 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra después sobre una membrana de 0,45 µm, a continuación se vierten 14 ml de metanol a una temperatura cercana a 10°C. La disolución se lleva después a 20°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 36 ml de metanol y a continuación se agita 1 hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 30 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de secado, se obtienen 1,25 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 78%.

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

Peso molecular medio: 2.400 Daltons

Actividad anti-Xa: 154,3 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1,6 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 96,4

EJEMPLO 11

Despolimerización y transformación en sal de sodio :

En un erlenmeyer A, se introducen 140 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 20 g (0,019 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Después de disolución completa a una temperatura cercana a 40°C y vuelta a una temperatura cercana a 20°C, se añaden 3,5 ml (0,011 mol) de terc-butilimino-tri(pirrolidino)fosforano. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 60 g de acetato de sodio anhidro en 600 ml de metanol. Después de disolución completa, se añade a la disolución 10 g de celita Hyflo supercel. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en 1 minuto 30 segundos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 4°C. Después de 5 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante 30 minutos. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (400 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 400 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 1 hora 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (250 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 250 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 200 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de secado, se obtienen 5,39 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es 69%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 5 g (0,0076 moles) de la heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente y 35 ml de agua. La disolución se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 2 veces con 10 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 250 ml. Con agitación magnética, se introduce 1 ml (0,01 mol) de lejía de sosa al 30 %, a una temperatura cercana a 4°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 2 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 6 g de cloruro de sodio. Se añaden al medio de reacción 42 ml de metanol. Después de 15 minutos de agitación se añaden 104 ml de metanol, después se agita durante 15 minutos. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 1 de

hora a una temperatura cercana a 4°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (140 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 140 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 45 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (160 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 160 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 100 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 48 horas de secado, se obtienen 2,7 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 59%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 2,6 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 25 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,7 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,15 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 3 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra después sobre una membrana de 0,45 µm, a continuación se vierten 21 ml de metanol a una temperatura cercana a 10°C. La disolución se lleva después a 20°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 54 ml de metanol y a continuación se agita una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 20 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 50 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 20 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). El precipitado en suspensión se filtra sobre Vidrio Fritado 3. La torta blanca obtenida se lava a continuación con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 2,35 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 90%.

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

Peso molecular medio: 2.400 Daltons

Actividad anti-Xa: 167,5 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1,1 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 152

EJEMPLO 12

Despolimerización y transformación en sal de sodio (0,05 % de agua) :

En un erlenmeyer, se introducen 140 ml de diclorometano. Con agitación, se cargan lentamente 20 g (0,019 moles) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación : 75%, sal de bencetonio) obtenido como se ha descrito en el ejemplo A. Se añaden 20 g de tamiz molecular 4 A al medio de reacción y el contenido de agua se lleva a 0,05% agitando lentamente durante 48h . El sobrenadante se transfiere en atmósfera inerte a un erlenmeyer A. Después de la disolución completa, se añaden 3,5 ml (0,012 moles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina. Se agita a una temperatura próxima a 20°C, durante 24 horas. Durante este tiempo, se prepara en un erlenmeyer B, una disolución de 60 g de acetato de sodio anhidro en 600 ml de metanol. Después de disolución completa, se añade a la disolución 10 g de celita Hyflo supercel. Con agitación magnética, la mezcla de reacción del erlenmeyer A se vierte en aproximadamente 2 minutos en la disolución metanólica de acetato de sodio a una temperatura próxima a 4°C. Después de 15 minutos de agitación se deja decantar la suspensión durante 1 hora. La parte transparente del sobrenadante se recoge y se separa (420 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 420 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 1 hora aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (450 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 450 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. La suspensión se filtra a continuación sobre vidrio fritado 3. La torta obtenida se lava a continuación con 200 ml de metanol. El sólido amarillo claro húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de 16 horas de secado, se obtienen 5,36 g de la sal de sodio de la heparina despolimerizada bruta en la celita (10 g). El rendimiento obtenido es 68,6%.

Saponificación :

En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 5,36 g (0,00817 moles) de la heparina despolimerizada bruta, sal de sodio en la celita (10 g) obtenida anteriormente y 50 ml de agua. La suspensión se filtra sobre vidrio fritado 3 veces y se aclara 4 veces con 15 ml de agua. El filtrado obtenido se carga en un erlenmeyer de 150 ml. Con agitación magnética, se introduce 1,01 ml (0,0122 mol) de lejía de sosa al 35 %, a una temperatura cercana a 4°C. Después de la adición, la mezcla se agita durante 3 horas. Se neutraliza la disolución por adición de HCl 1N y se añaden 11 g de cloruro de sodio. Se añaden al medio de reacción 77 ml de metanol. Después de 15 minutos de agitación se añaden 200 ml de metanol, después se agita durante una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 1 de hora a una temperatura cercana a 4°C. El sobrenadante se recoge y se desecha (240 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 240 ml de metanol y se agita durante 10 minutos. Se deja re-

sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (225 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 225 ml de metanol y se agita durante 10 minutos. La suspensión se filtra a continuación sobre vidrio fritado 3. La torta obtenida se lava 2 veces con 50 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 40°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 2,65 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 53,7%.

Purificación:

En un erlenmeyer de 100 ml, se introducen 2,65 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 26,5 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a 40°C con agitación magnética. Por adición de sosa 1N, se lleva el pH a 9,7 ± 0,1. El medio de reacción se filtra sobre membrana de 0,45 µm y se añaden 0,25 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. Después de alrededor de 2 horas de agitación, a una temperatura cercana a 20°C la mezcla se neutraliza por adición de HCl 1 N, después se añaden 3 g de cloruro de sodio. La disolución se filtra después sobre una membrana de 0,45 µm, a continuación se vierten 21 ml de metanol a una temperatura cercana a 10°C. La disolución se lleva después a 20°C y se agita 15 minutos. Se añaden entonces 54 ml de metanol y a continuación se agita una hora. La agitación se para y se deja sedimentar la suspensión durante 45 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (46 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 46 ml de metanol y se agita durante 5 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (50 ml). Se añaden 50 ml de metanol y el precipitado en suspensión se filtra después sobre vidrio fritado 4. La torta blanca obtenida se lava con 2 partes de 10 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 2,363 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 89,1%.

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

Peso molecular medio: 2.500 Daltons

Actividad anti-Xa: 192 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1,3 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa : 148

REIVINDICACIONES

1. Mezclas de oligosacáridos 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 2000 a 3000 daltons,

- tienen una actividad anti-Xa > 150 UI/mg y < 200 UI/mg,

- tienen una actividad anti-IIa inferior a 10 UI/mg,

- tienen una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 30,

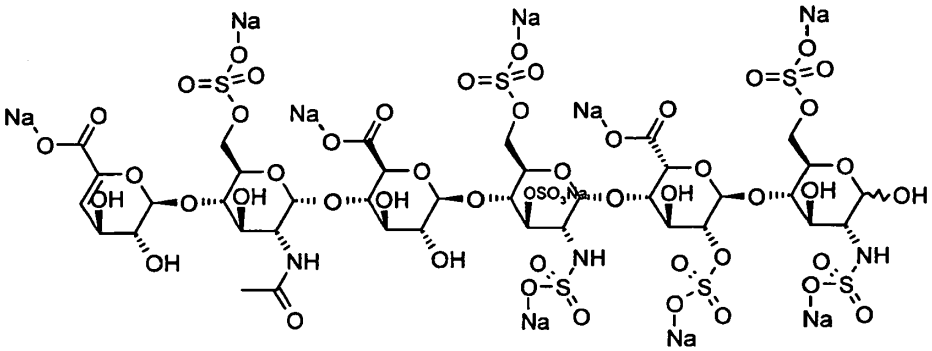
- los oligosacáridos constitutivos de las mezclas :

- contienen de 2 a 26 restos sacarídicos,

- tienen un resto ácido urónico-4,5 insaturado 2-O-sulfato en uno de sus extremos,

- contienen una fracción hexasacárida que representa de 15 a 25 % de las mezclas de oligosacáridos,

- contienen de 8 a 15 % del hexasacárido ΔIIa-II<u>s</u>-Is en la fracción hexasacárido



ΔIIa II<u>s</u> Is

y están en forma de una sal de metal alcalino o alcalinotérreo.

2. Mezcla de oligosacáridos según la reivindicación 1, caracterizada por que la sal de metal alcalino o alcalinotérreo se elige entre las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio.

3. Mezcla de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada por que tiene actividad anti-IIa inferior a 5 UI/mg .

4. Mezcla de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizada por que presenta una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 50 .

5. Mezcla de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 à 4 caracterizada por que tiene un peso molecular medio comprendido entre 2400 y 2650 Da.

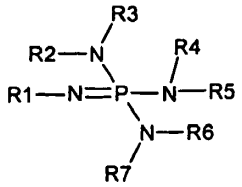
6. Mezcla de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 à 5 caracterizada por que presenta una actividad anti-Xa > 150 UI/mg y < 200 UI/mg, una actividad anti-IIa comprendida entre 0,5 y 3,5 UI/mg, y un peso moléculas medio comprendido entre 2400 y 2650 Da.

7. Procedimiento de preparación de las mezclas de oligosacáridos tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, durante el que se despolimeriza la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina en medio orgánico en presencia de una base orgánica fuerte de pKa superior a 20, caracterizado pro que la base orgánica utilizada consiste en la familia de los fosfazenos que contiene un porcentaje de agua inferior a 0,3%.

8. Procedimiento de preparación según la reivindicación 7 de mezclas de oligosacáridos según la reivindicación 1, caracterizado por que el contenido de agua es inferior al 0,2 %.

9. Procedimiento de preparación según las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por que la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina es la sal de bencetonio, de cetilpiridinio o de cetiltrimetil amonio.

10. Procedimiento de preparación según las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por que las bases de la familia de los fosfazenos son las de fórmula :



en la que los radicales R_1 a R_7 son idénticos o diferentes y representan radicales alquilo lineales o ramificados que contienen de 1 a 6 átomos de carbono.

11. Procedimiento de preparación según la reivindicación 10, caracterizado por que la base de la familia de los fosfazenos utilizada en la etapa de despolimerización es la 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina o el terc-butilimino-tri(pirrolidino)-fosforano.

12. Procedimiento de preparación según las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por que la relación en moles base fuerte/éster está comprendido entre 0,2 y 5.

13. Procedimiento de preparación según las reivindicaciones 7 u 8 en el que se efectúan las operaciones siguientes :

a) Transalificación de la heparina de sodio por acción de cloruro de bencetonio,

b) Esterificación del heparinato de bencetonio obtenido por acción de cloruro de bencilo,

c) Transalificación del éster bencílico obtenido y obtención de la sal de amonio cuaternario,

d) Despolimerización de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina por el método tal como se define en la reivindicación 7 u 8,

e) Transformación de la sal de amonio cuaternario en sal de sodio,

f) Opcionalmente saponificación de la heparina por acción de una base,

g) Opcionalmente purificación

14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la reacción de la etapa a) se realiza por acción del cloruro de bencetonio en exceso, sobre la heparina sódica, a una temperatura cercana a 15 a 25°C con una relación molar sal/heparina sódica comprendida entre 3 y 4.

15. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la esterificación de la etapa b) se efectúa en el seno de un disolvente orgánico clorado a una temperatura comprendida entre 25 y 45°C, y el éster en forma de sal de sodio se recupera a continuación por precipitación por medio de acetato de sodio al 10 % en peso en un alcohol a razón de 1 a 1,2 volúmenes de alcohol por volumen de medio de reacción.

16. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 15, caracterizado por que el nivel de esterificación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina está comprendido entre 50 y 100 %.

17. Procedimiento según la reivindicación 13, 15 ó 16 caracterizado por que se utiliza de 0,5 a 1,5 partes en peso de cloruro de bencilo por 1 parte en peso de sal de bencetonio de la heparina con un tiempo de reacción que estará comprendido entre 10 y 35 h.

18. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la transalificación de la etapa c) se efectúa por medio de un cloruro de amonio cuaternario en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre 10 y 25°C.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado por que la relación en moles de cloruro de amonio cuaternario/sal de sodio del éster bencílico de la heparina está comprendida entre 2 y 3.

20. Procedimiento según la reivindicación 13 caracterizado por que la transformación en sal de sodio de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada (etapa e) se efectúa por tratamiento del medio de reacción con una disolución alcohólica de acetato de sodio, a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C.

21. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la saponificación (etapa f) se efectúa por medio de un hidróxido de metal alcalino en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre 0 y 20°C.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado por que se utiliza de 1 a 5 equivalentes molares de hidróxido de metal alcalino.

23. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que se purifica (etapa g) por medio de peróxido de hidrógeno, en medio acuoso, a una temperatura de 10 a 50°C .

24. Medicamento que contiene las mezclas de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

25. Medicamento según la reivindicación 24, caracterizado por que presenta una actividad antitrombótica.

26. Medicamentos según las reivindicaciones 24 ó 25, para la prevención o el tratamiento de trombosis venosas y arteriales, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, angina inestable, infarto de miocardio, isquemia cardiaca, enfermedades oclusivas de las arterias periféricas y fibrilación auricular, proliferación de las células musculares lisas aterosclerosis y arteriosclerosis, cáncer por la modulación de la angiogénesis y los factores de crecimiento y de los trastornos diabéticos.

27. Composiciones farmacéuticas que contienen al menos un medicamento tal como se ha definido en la reivindicación 24 y uno o varios excipientes o vehículos o aditivos farmacéuticamente inertes.

28. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 27, caracterizadas por que consisten en disoluciones inyectables por vía subcutánea o intravenosa.

29. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 27, caracterizadas por que consisten en una formulación por inhalación destinada a la vía pulmonar.

30. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 27, caracterizadas por que consisten en una formulación para una administración destinada a la vía oral.

31. Mezclas de oligosacáridos sulfatados según la reivindicación 1, susceptibles de ser obtenidas por el procedimiento tal como se define en la reivindicación 13.