



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2003/10/08
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2004/04/22
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2005/04/07
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2003/002960
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2004/033503
(30) Priorité/Priority: 2002/10/10 (0212584) FR

(51) Cl.Int.⁷/Int.Cl.⁷ C08B 37/10, A61K 31/727

(71) Demandeur/Applicant:
AVENTIS PHARMA S.A., FR

(72) Inventeurs/Inventors:
BIBEROVIC, VESNA, FR;
GRONDARD, LUC, FR;
MOURIER, PIERRE, FR;
VISKOV, CHRISTIAN, FR

(74) Agent: BERESKIN & PARR

(54) Titre : MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE, LEUR PREPARATION ET LES
COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT

(54) Title: HEPARIN-DERIVED POLYSACCHARIDE MIXTURES, PREPARATION THEREOF AND PHARMACEUTICAL
COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine ayant un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 Dalton et un rapport Anti-Xa/Anti-IIa supérieur à 30, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
22 avril 2004 (22.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/033503 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C08B 37/10, A61K 31/727(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002960

(22) Date de dépôt international : 8 octobre 2003 (08.10.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0212584 10 octobre 2002 (10.10.2002) FR

(71) Déposant : AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 ANTONY (FR).

(72) Inventeurs: BIBEROVIC, Vesna; 25 Allée du Sagittaire, F-93600 AULNAIS-SOUS-BOIS (FR). GRONDARD, Luc; 9 Square Babourd, F-91080 COURCOURONNES (FR). MOURIER, Pierre; 1 rue Etienne Mehul, F-94220 CHARENTON LE PONT (FR). VISKOV, Christian; 3 rue du Béarn, F-91130 RIS ORANGIS (FR).

(74) Mandataire : ROUSSEAU, Pierrick; AVENTIS PHARMA S.A., Direction des Brevets, 20 Avenue Raymond Aron, F-92165 ANTONY CEDEX (FR).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: HEPARIN-DERIVED POLYSACCHARIDE MIXTURES, PREPARATION THEREOF AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre : MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT

(57) Abstract: The invention concerns heparin-derived polysaccharide mixtures having an average molecular weight of 1500 to 3000 daltons and an anti-Xa/anti-IIa ratio higher than 30, their preparation method and pharmaceutical compositions containing same.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine ayant un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 Dalton et un rapport Anti-Xa/Anti-IIa supérieur à 30, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.



WO 2004/033503 A1

MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE, LEUR
PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT

La présente invention concerne des mélanges de
5 polysaccharides dérivés d'héparine, leur procédé de
préparation et les compositions pharmaceutiques les
contenant.

L'héparine est un mélange de mucopolysaccharides
sulfatés d'origine animale, utilisée notamment pour ses
10 propriétés anticoagulantes et antithrombotiques.

L'héparine présente cependant des inconvénients qui
limitent les conditions de son utilisation. En particulier,
son activité anticoagulante importante (anti IIa) peut
occasionner des hémorragies.

15 Des héparines de bas poids moléculaire obtenues par
dépolymérisation basique d'esters d'héparine ont été
proposées (EP40144) ; Cependant ces produits présentent
encore une activité anti-IIa importante.

Des héparines de très bas poids moléculaire ont
20 également été décrites dans US6384021. Cependant les valeurs
d'activité Anti-Xa obtenues dans les exemples décrits ne
dépassent pas les 120 UI, et le ratio Anti-Xa/Anti-IIa obtenu
est compris entre 15 et 50.

Dans WO-0208295, des héparines de très bas poids
25 moléculaires sont préparés par un procédé différent de
US6384021 et présentent une activité comprises entre 100 et
150 UI avec des ratio Anti-Xa/Anti-IIa également très élevés
pour certains exemples d'application.

Il existe toutefois un besoin constant dans cette classe
30 de médicament d'améliorer les activités Anti-Xa, notamment en
obtenant des activités supérieures à 150 UI/mg, ainsi que le
ratio AntiXa/AntiIIa, et donc de mettre au point de nouvelles
générations de dérivés d'Héparines.

Un des objectifs de l'invention est donc d'améliorer
35 l'activité anti-Xa et le ratio Anti-Xa/Anti-IIa en modifiant
les procédés décrits dans l'art antérieur, notamment en
contrôlant le pourcentage d'eau lors de l'étape de

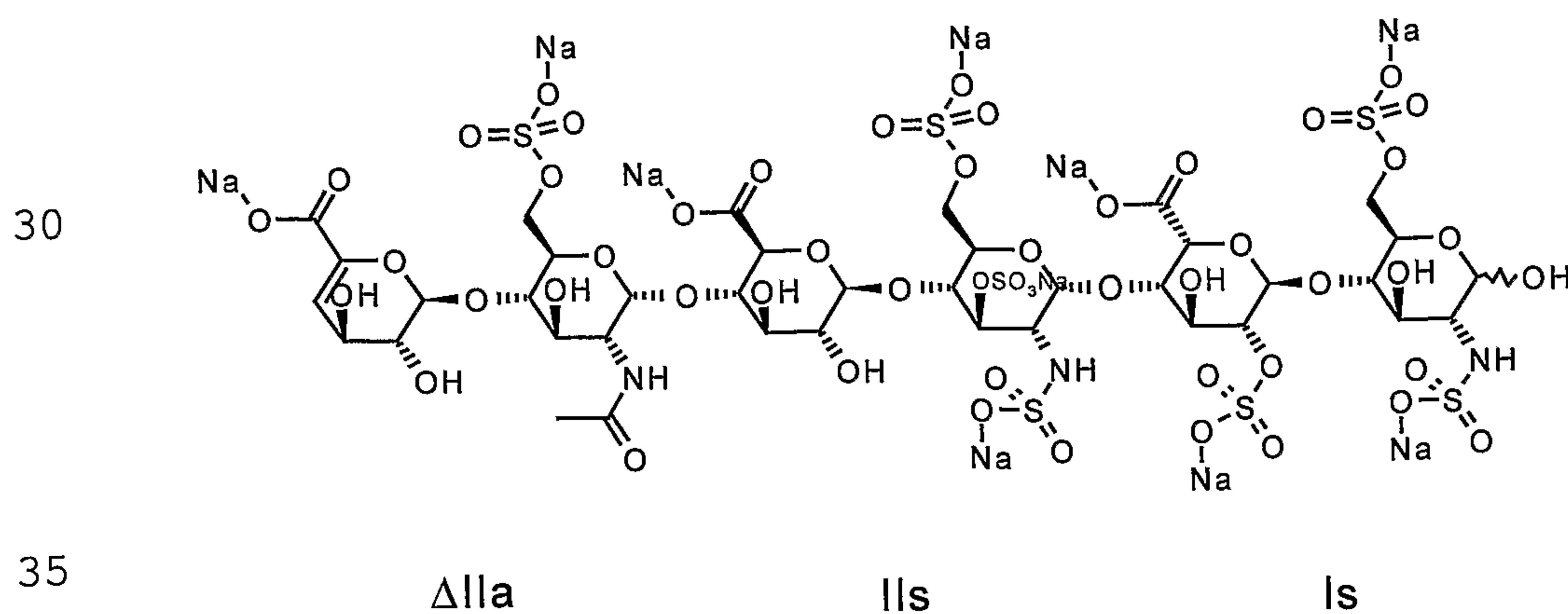
dépolymérisation. Les héparines ainsi obtenues présentent ainsi une excellente activité antitrombotique et possèdent une activité aXa voisine de celle de l'héparine tout en diminuant les risques de d'hémorragie avec une très faible
 5 activité aIIa. De même, les produits de l'invention présentent des durées de demi-vie très supérieure à celle de l'héparine.

L'invention a donc pour objet de nouveaux mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine possédant une activité
 10 plus sélective vis-à-vis du facteur X activé (facteur Xa) et du facteur II activé (facteur IIa) que l'héparine.

Il est entendu que les mélange de Polysaccharides ayant poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 Da peuvent être qualifiés d'oligosaccharides.

15 La présente invention a donc pour objet les mélanges d'oligosaccharides sulfatés possédant la structure générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine et présentant les caractéristiques suivantes :

- ils ont un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 daltons,
- 20 une activité anti-Xa de 120 à 200 UI/mg, une activité anti-IIa inférieure à 10 UI/mg et un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 30,
- les oligosaccharides constitutifs des mélanges contiennent 2 à 26 motifs saccharidiques, ont un motif acide uronique-4,5
- 25 insaturé 2-O-sulfate à l'une de leurs extrémités, et contiennent l'hexasaccharide Δ IIa-II $\underline{s}$ -Is de formule :



L'hexasaccharide Δ IIa-II $\underline{s}$ -Is contenu dans le mélange
5 d'oligosaccharides décrit dans la présente invention est une
séquence fortement affine à l'ATIII et caractérisé par une
activité aXa supérieure à 740 U/mg.

Le mélange d'oligosaccharides décrit dans la présente
invention est sous forme d'un sel de métal alcalin ou
10 alcalinoterreux.

Comme sel de métal alcalin ou alcalinoterreux, sont
préférés les sels de sodium, potassium, calcium et magnésium.

Le poids moléculaire moyen est déterminé par chromato-
graphie liquide haute pression en utilisant deux colonnes en
15 série par exemple celles commercialisées sous le nom de
TSK G3000 XL et TSK G2000 XL. La détection est réalisée par
réfractométrie. L'éluant utilisé est du nitrate de lithium et
le débit est de 0,6 ml/min. Le système est calibré avec des
standards préparés par fractionnement de l'Enoxaparine
20 (AVENTIS) par chromatographie sur gel d'agarose-
polyacrylamide (IBF). Cette préparation est réalisée selon la
technique décrite par Barrowcliffe et al, Thromb. Res., 12,
27-36 (1977-78) ou D.A. Lane et al, Thromb. Res., 12, 257-271
(1977-78). Les résultats sont calculés à l'aide du logiciel
25 GPC6 (Perkin Elmer).

L'activité anti-Xa est mesurée par la méthode
amydolytique sur un substrat chromogénique décrite par Teien
et al, Thromb. Res., 10, 399-410 (1977), avec comme étalon le
premier étalon international des héparines de bas poids
30 moléculaire.

L'activité anti-IIa est mesurée par la technique décrite
par Anderson L.O. et al, Thromb. Res., 15, 531-541 (1979),
avec comme étalon le premier étalon international des
héparines de bas poids moléculaire.

35 La fraction hexasaccharide représente de préférence de
15 à 25 % du mélange d'oligosaccharides.

De préférence, les mélanges selon l'invention
contiennent de 8 à 15 % de l'hexasaccharide Δ IIa-II $\underline{s}$ -Is dans

la fraction hexasaccharide du mélange d'oligosaccharides.

Le pourcentage de la fraction hexasaccharide peut être déterminée de façon analytique par chromatographie liquide haute pression sur colonnes TSK G3000 XL et TSK G2000 XL ou
5 bien par séparation préparative de la fraction hexasaccharide. Le mélange est dans ce cas chromatographié sur des colonnes remplies de gel de type polyacrylamide agarose tel que celui commercialisé sous la marque Ultrogel ACA202^R (Biosepra). Le mélange est élué par une solution
10 d'hydrogénocarbonate de sodium. De préférence, la solution d'hydrogénocarbonate de sodium est une solution de 0,1 mol/l à 1 mol/l. Encore plus préférentiellement, la séparation est réalisée à une concentration de 1 mole/l. La détection est réalisée par spectrométrie UV (254nm). Après fractionnement,
15 la fraction hexasaccharide en solution dans l'hydrogénocarbonate de sodium est neutralisée par de l'acide acétique glacial. La solution est ensuite concentrée sous pression réduite de façon à obtenir une concentration en acétate de sodium supérieure à 30 % en poids. La fraction
20 d'hexasaccharide est précipitée par addition de 3 à 5 volumes de méthanol. La fraction d'hexasaccharides est récupérée par filtration sur verre fritté n°3. Le mélange d'hexasaccharides obtenu peut être analysé par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) pour en déterminer la teneur en
25 hexasaccharide Δ IIa-II_s-Is. L'hexasaccharide Δ IIa-II_s-Is peut être isolé par chromatographie CLHP préparative ou par chromatographie d'affinité sur colonne antithrombine III sepharose selon les techniques utilisées par l'homme du métier (M. Hook, I. Bjork, J. Hopwood and U. Lindahl, *F.E B.S*
30 *letters*, vol 656(1) (1976)).

Tout particulièrement, les mélanges selon l'invention ont une activité anti-Xa comprise entre 150 UI/mg et 200 UI/mg.

De préférence, les mélanges selon l'invention ont une
35 activité anti-IIa inférieure à 5 UI/mg, et tout particulièrement de 0,5 à 3,5 UI/mg. Les exemples d'applications décrits plus bas mettent en évidence des valeurs comprises entre 1,1 et 1,6 UI/mg lorsqu'on met en

œuvre les caractéristiques préférées du procédé

De préférence, les mélanges présentent un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 50 et tout particulièrement supérieur à 100.

5 De préférence, les mélanges selon l'invention ont un poids moléculaire moyen compris entre 2000 et 3000 Daltons, et tout particulièrement un poids moléculaire moyen compris entre 2400 et 2650 Da.

10 L'invention a donc tout particulièrement pour objet les mélanges tels que définis précédemment présentant une activité anti Xa comprise entre 150 et 200 UI/mg, une activité AntiIIa comprise entre 0,5 et 3,5 UI/mg et un poids moléculaire moyen compris entre 2400 et 2650 Da.

15 Les mélanges d'oligosaccharides selon l'invention peuvent être préparés par dépolymérisation d'un sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine en milieu organique, au moyen d'une base organique forte de pKa de préférence supérieur à 20 (propriétés de préférence apparentées à la famille des phosphazènes définies par
20 exemple selon R. Schwesinger et al, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987), R. Schwesinger et al, Angew. Chem. 105, 1420 (1993)), transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium, saponification des esters résiduels et
25 éventuellement purification. Le procédé selon l'invention reprend les grandes étapes du procédé tel que décrit dans W0 0208295 tout en ajoutant une caractéristique essentielle qui permet d'obtenir les mélanges d'oligosaccharides selon l'invention avec les caractéristiques physico-chimiques et
30 les activités décrites plus haut.

En effet, pour obtenir les mélanges d'oligosaccharides spécifique selon l'invention, il est nécessaire de contrôler la sélectivité de la base par un contrôle très précis de la teneur en eau du mélange pendant l'étape de dépolymérisation.

35 Le procédé selon la présente invention est en effet caractérisé par un contrôle de la forte sélectivité de la base lors de la dépolymérisation. Elle permet de dépolymériser l'héparine tout en préservant au maximum les séquences

affines à l'ATIII tel que l'hexasaccharide Δ IIa-II_s-Is décrit dans la présente invention. Cette étape critique du procédé permet d'obtenir les polysaccharides selon l'invention.

Cette caractéristique du procédé se traduit par des
5 activités aXa inattendues au regard du poids moléculaire moyens des mélanges d'oligosaccharides ($150 \text{ UI/mg} < \text{aXa} < 200 \text{ UI/mg}$ pour un poids moléculaire moyen compris entre 2000 Da et 3000 Da). Cette sélectivité est due aux caractéristiques physico-chimiques très particulières des bases phosphazène
10 qui présentent un pKa supérieur à 20, un très fort encombrement stérique et une faible nucléophilicité.

Cet effet s'exprime pleinement lorsque le milieu réactionnel est anhydre. Par contre, lorsque la teneur en eau du milieu réactionnel augmente, on observe une diminution
15 drastique de la sélectivité de la dépolymérisation. La préservation des séquences affines à l'ATIII diminue et la conséquence est une chute importante de l'activité aXa. En présence de faible quantité d'eau, la base phosphazène se protone et l'espèce réactive devient un hydroxyde d'ammonium
20 quaternaire. Dans ce cas, les propriétés de très fort encombrement stérique et faible nucléophilicité sont perdues et influent fortement sur la qualité du produit obtenu. Lorsque l'on réalise des essais de dépolymérisation avec une teneur en eau mesurée et contrôlée, on peut voir cet effet
25 pleinement s'exprimer.

Le tableau suivant résume l'impact de la teneur en eau sur la sélectivité de la dépolymérisation (seul ce paramètre est variable dans les essais : les stœchiométries des réactifs, les dilutions, les températures restent constantes
30 selon les critères de l'homme de l'art. La base utilisée est la base phosphazène : 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3 diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine).

Teneur en eau %	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

7

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

Pour une sélectivité optimale et une préservation maximale des séquences affines à l'ATIII, il est préférable de d'opérer à des teneurs en eau inférieures à 0,6 % et tout particulièrement inférieure à 0,3 % lorsque l'on travaille avec 1 équivalent molaire de base phosphazène par rapport à l'ester benzylique de l'héparine, sel de benzéthonium.

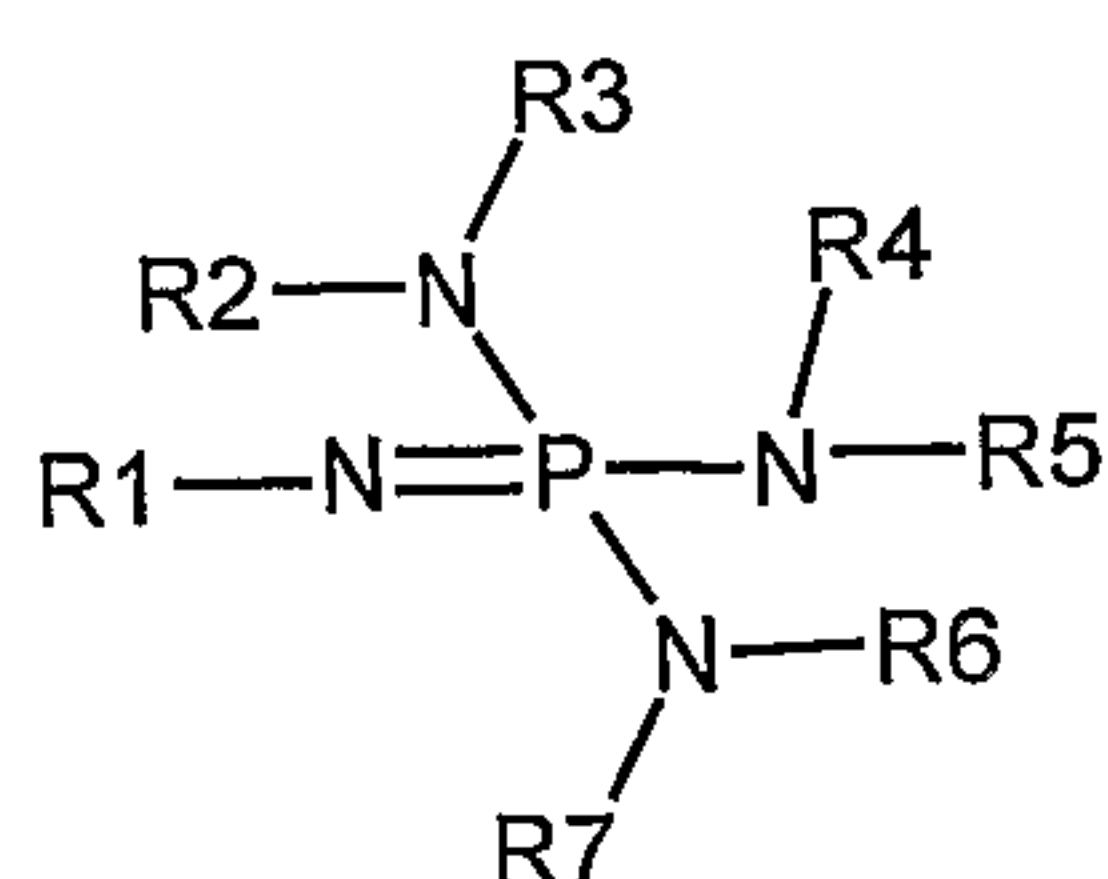
L'invention a donc tout particulièrement pour objet l'étape de dépolymérisation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine obtenue selon les méthodes connues de l'homme du métier caractérisé en ce qu'on utilise une base de la famille des phosphazènes, notamment en solution dichlorométhane, renfermant un pourcentage d'eau inférieur à 0,6 %. De préférence, ce pourcentage d'eau devra être choisi inférieur à 0,3 % et tout particulièrement inférieur à 0,2 %.

Avantageusement, le rapport en mole base forte/ester est compris entre 0,2 et 5, de préférence entre 0,6 et 2 et tout particulièrement entre 0,8 et 1,2. L'utilisation du rapport équimoléculaire fait donc partie des modes d'exécution préférés de l'invention.

D'autres solvants aprotiques connus de l'homme du métier peuvent être utilisés tels que le THF ou le DMF.

Le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est de préférence le sel de benzéthonium, de cétypyridinium ou de cétyltriméthyl ammonium.

Les bases de la famille des phosphazènes sont, de préférence, celles de formule :



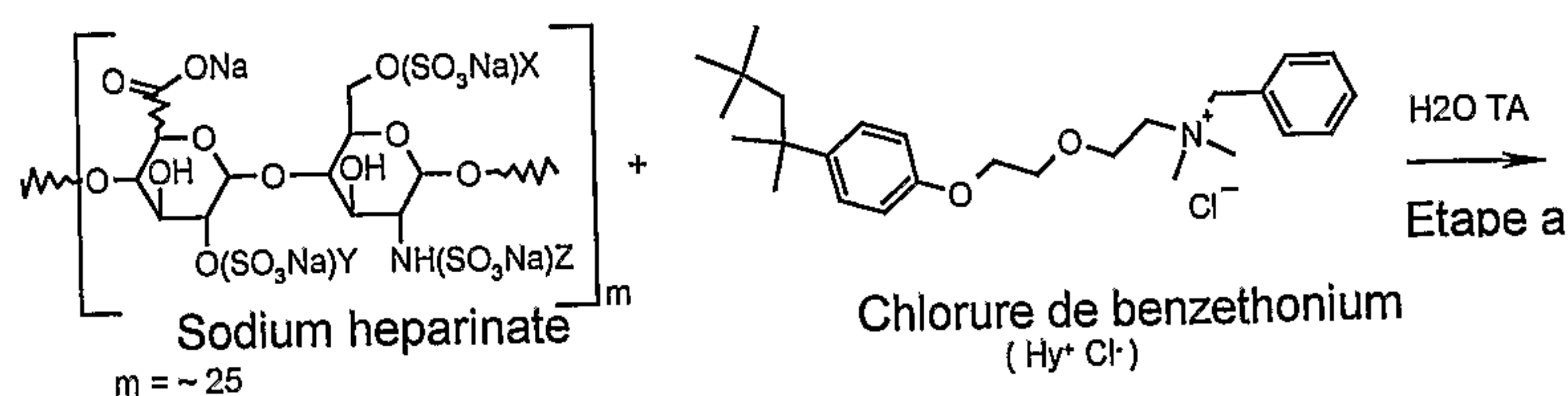
dans laquelle les radicaux R1 à R7 sont identiques ou différents et représentent des radicaux alkyle.

5 Dans les formules précédentes, les radicaux alkyle contiennent 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée.

L'invention a donc pour objet un procédé de préparation des mélanges d'oligosaccharides selon l'invention comprenant
10 les étapes suivantes

- a) Transalification de l'héparine de sodium par action de chlorure de benzéthonium,
- b) Estérification de l'héparinate de benzéthonium par action de chlorure de benzyle,
- 15 c) Transalification de l'ester benzylique obtenu en sel d'ammonium quaternaire,
- d) Dépolymérisation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine par la méthode telle que définie plus haut,
- 20 e) Transformation du sel d'ammonium quaternaire en sel de sodium,
- f) Eventuellement saponification de l'héparine par action d'une base telle que la soude
- g) Eventuellement purification notamment par action d'un agent
25 d'oxydation tel que l'eau oxygénée.

Le schéma réactionnel suivant illustre la présente invention :

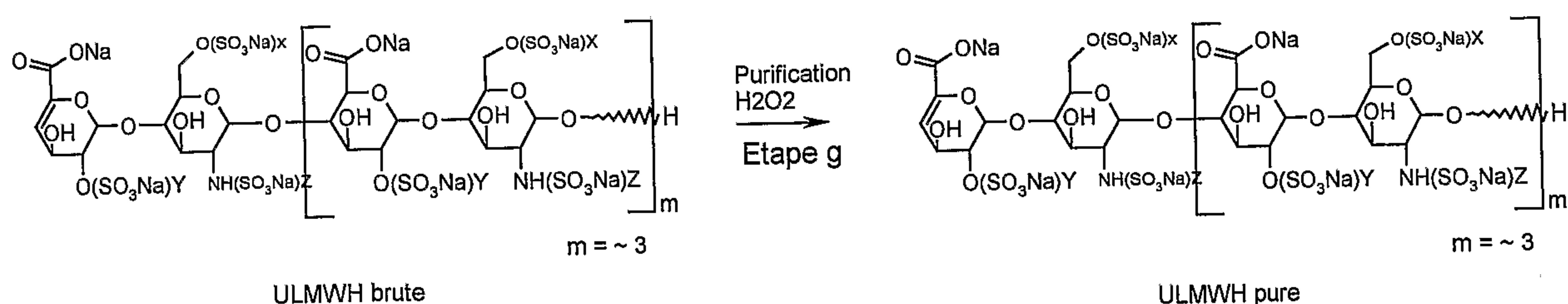
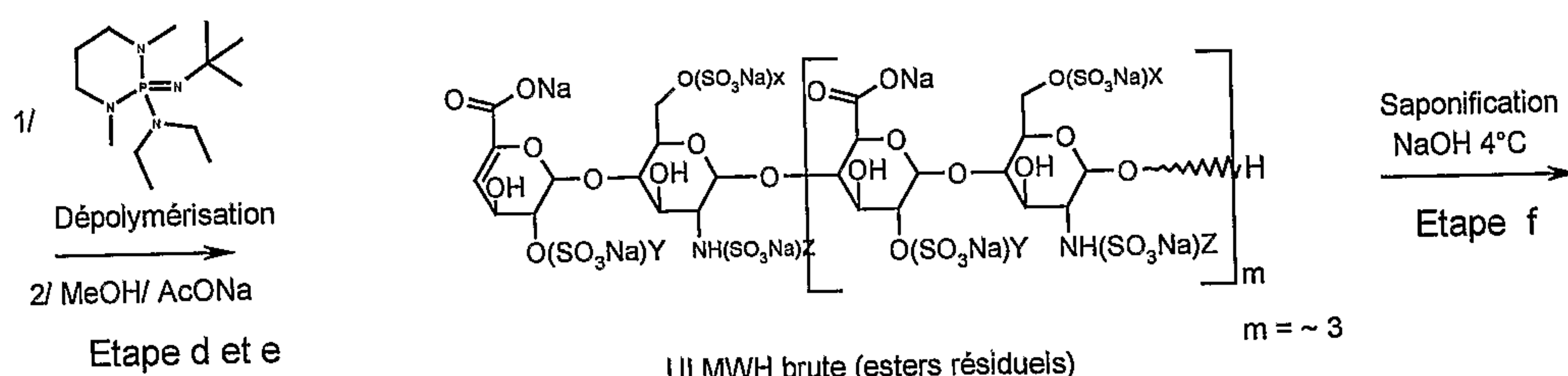
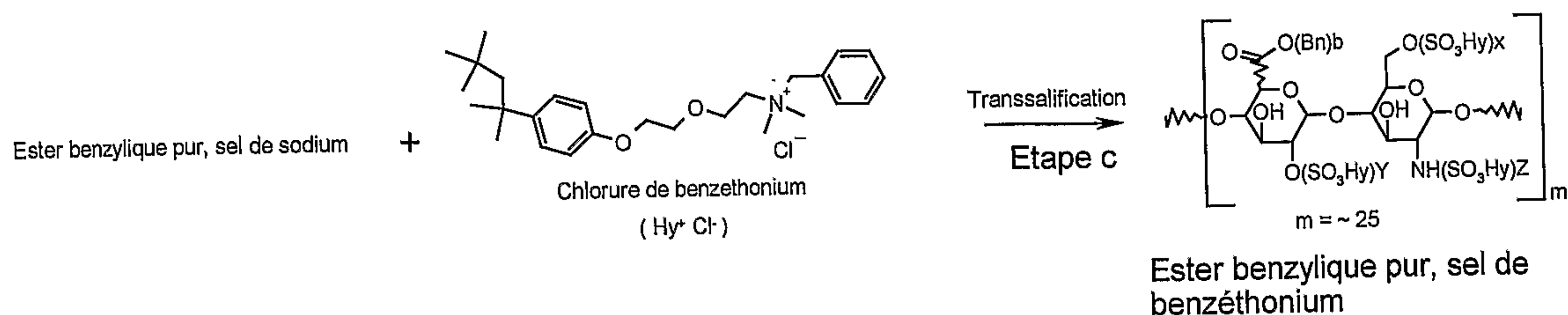
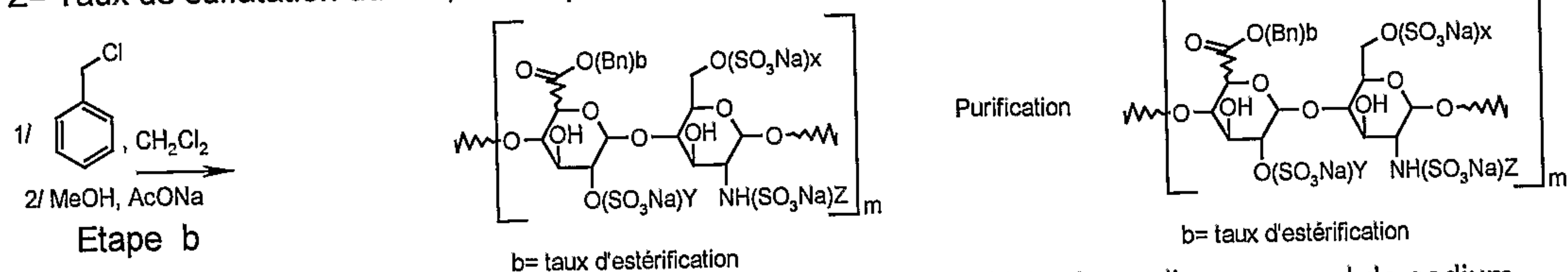


$n = X + Y + Z$ (taux de sulfatation global du dissaccharide moyen)

X = Taux de sulfatation du site, le complément est représenté par le radical H

Y = Taux de sulfatation du site, le complément est représenté par le radical H

Z = Taux de sulfatation du site, le complément est représenté par le radical COCH_3



La transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium (étape e) est effectuée, généralement, par traitement du milieu réactionnel avec une solution alcoolique d'acétate de sodium et, de préférence avec une solution à 10 % d'acétate de sodium dans le méthanol (poids/volume), à une température comprise entre 15 et 25°C. L'équivalent en poids

d'acétate ajouté est préférentiellement 3 fois supérieur à la masse de sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine engagé dans la réaction de dépolymérisation.

La saponification (étape f) s'effectue généralement au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin tel que la soude, la potasse, l'hydroxyde de lithium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 0 et 20°C et de préférence 0 et 10°C. On utilisera de façon générale de 1 à 5 équivalents molaires d'hydroxyde de métal alcalin. De préférence, la saponification sera réalisée en présence de 1 à 2 équivalents molaires d'hydroxyde de métal alcalin.

Le produit final peut éventuellement être purifié (étape g) par toute méthode connue de purification des héparines dépolymérisées (par exemple EP 0037319B1). De préférence, on purifie au moyen de peroxyde d'hydrogène, en milieu aqueux, à une température de 10 à 50°C. De préférence, cette opération sera réalisée entre 20 et 40°C.

Le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine peut être préparé selon le schéma réactionnel suivant :

- a) transformation de l'héparine de sodium au moyen du chlorure de benzéthonium pour obtenir l'héparinate de benzéthonium (Transalification),
- b) estérification du sel de benzéthonium obtenu précédemment au moyen du chlorure de benzyle puis traitement par une solution alcoolique d'acétate de sodium pour obtenir le sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine,
- c) transalification du sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine en sel d'ammonium quaternaire et, de préférence en sel de benzéthonium, de cétyl pyrinium ou de cétyltriméthyl ammonium.

La réaction de l'étape a) est réalisée par action du chlorure de benzéthonium en excès, sur l'héparine sodique, à une température voisine de 15 à 25°C. De manière avantageuse, le rapport molaire sel/héparine sodique est compris entre 3 et 4.

L'héparine de départ utilisée est de préférence une héparine de porc. Celle-ci peut être préalablement purifiée

pour diminuer son taux de sulfate de dermatan selon le procédé décrit dans le brevet FR2663639.

L'estérification de l'étape b) s'effectue de préférence au sein d'un solvant organique chloré (chloroforme, chlorure de méthylène par exemple), à une température comprise entre 25 et 45°C et, de préférence entre 30 et 40°C. L'ester sous forme de sel de benzéthonium est ensuite récupéré sous forme de sel de sodium par précipitation au moyen d'acétate de sodium à 10 % en poids dans un alcool tel que le méthanol. On 10 emploie généralement 1 à 1,2 volume d'alcool par volume de milieu réactionnel. La quantité de chlorure de benzyle et le temps de réaction sont adaptés pour obtenir un taux d'estérification compris entre 50 et 100 % et, de préférence, entre 70 et 90 %. De façon préférentielle, on utilise 0,5 à 15 1,5 parties en poids du chlorure de benzyle pour 1 partie en poids du sel de benzéthonium de l'héparine. De même, de façon préférentielle, le temps de réaction sera compris entre 10 et 35 h.

La transalification de l'étape c) s'effectue au moyen d'un chlorure d'ammonium quaternaire et, de préférence, au 20 moyen de chlorure de benzéthonium, de chlorure de cétylpyridinium ou de chlorure de cétyltriméthyl ammonium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 10 et 25°C. De manière avantageuse, le rapport en mole chlorure d'ammonium quaternaire/sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine 25 est compris entre 2 et 3.

Les mélanges selon l'invention sous forme de sel de sodium, peuvent être transformés en un autre sel d'un métal alcalin ou alcalinoterreux. On passe éventuellement d'un sel 30 à l'autre en utilisant la méthode décrite dans le brevet FR 73 13 580.

Les mélanges selon l'invention ne sont pas toxiques et peuvent ainsi être utilisés comme médicaments.

Les mélanges d'oligosaccharides de la présente invention 35 peuvent être utilisés comme agents antithrombotiques. En particulier, ils sont utiles pour le traitement ou la prévention des thromboses veineuses et artérielles, la

12

thrombose veineuse profonde, l'embolie pulmonaire, l'angor instable, l'infarctus du myocarde, l'ischémie cardiaque, les maladies occlusives des artères périphériques et la fibrillation auriculaire. Ils sont également utiles dans la
5 prévention et le traitement de la prolifération des cellules musculaires lisses l'athérosclérose et l'artériosclérose, pour le traitement et la prévention du cancer par la modulation de l'angiogénèse et des facteurs de croissance, et pour le traitement et la prévention des désordres diabétiques
10 tel que les rétinopathies et néphropathies diabétiques.

La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques contenant comme principe actif un mélange de formule (I) éventuellement en association avec un
15 ou plusieurs excipients inertes.

Les compositions pharmaceutiques sont par exemple des solutions injectables par voie sous-cutanée ou intraveineuse. Elles sont également utiles pour une administration par voie pulmonaire (inhalation) ou par voie orale.

20 La posologie peut varier en fonction de l'âge, du poids et de l'état de santé du patient. Pour un adulte, elle est en général comprise entre 20 et 100 mg par jour par voie intramusculaire ou sous-cutanée.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans
25 toutefois la limiter.

Exemple A : PREPARATION D'HEPARINATE DE BENZYLE SEL DE BENZETHONIUM

30 **Héparinate de benzéthonium**

A une solution de 10 g d'héparine de sodium dans 100 ml d'eau, on ajoute une solution de 25 g de chlorure de benzéthonium dans 125 ml d'eau. Le produit est filtré, lavé à l'eau et séché.

35

Ester benzylique d'héparine (sel de sodium)

A une solution de 20 g d'héparinate de benzéthonium dans

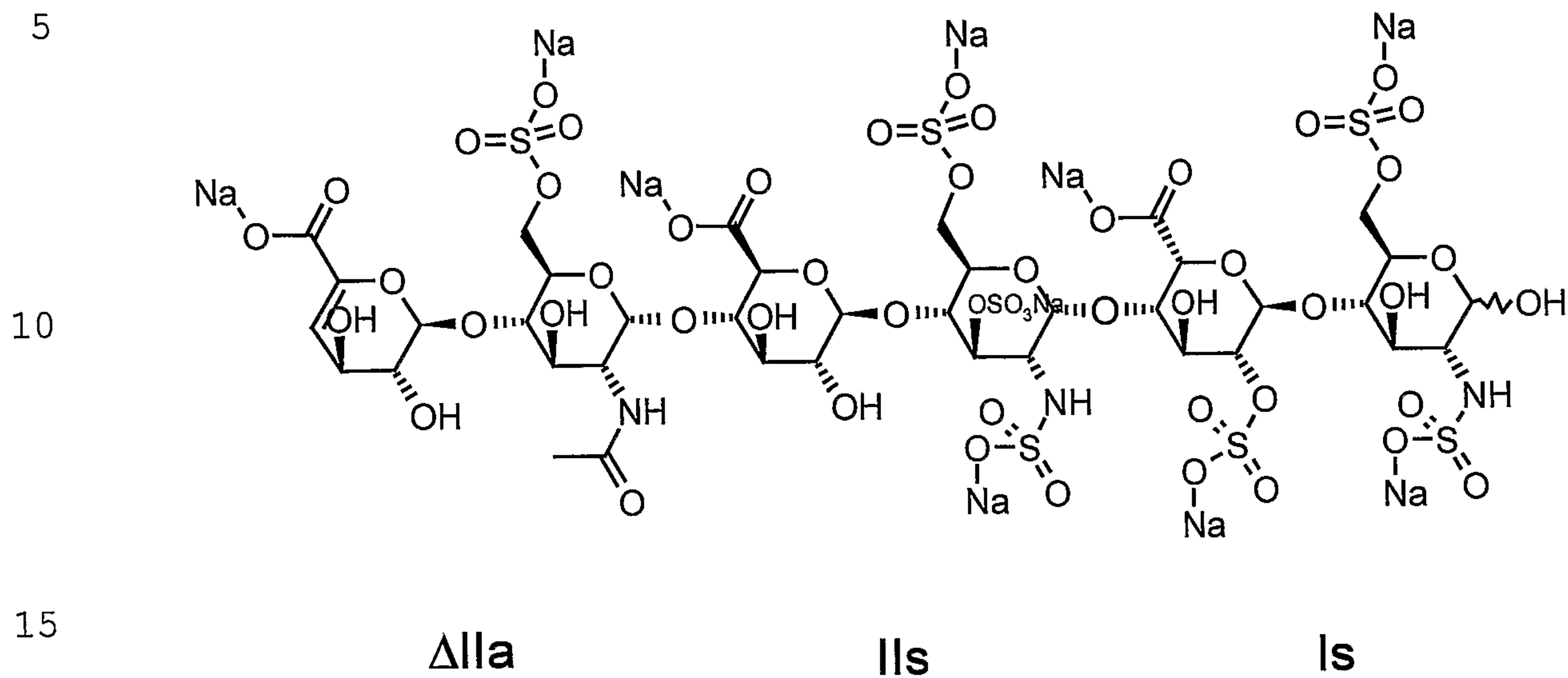
80 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 16 ml de chlorure de benzyle. La solution est chauffée à une température de 30°C pendant 12 heures. On ajoute alors 108 ml d'une solution à 10 % d'acétate de sodium dans le méthanol, filtre, lave au méthanol et sèche. On obtient ainsi 7,6 g d'ester benzylique d'héparine sous forme de sel de sodium dont le taux d'estérification est de 77 %.

Ester benzylique de l'héparine (sel de benzéthonium)

10 Dans un erlenmeyer A de 2 litres, on introduit 36 g (0,0549 mole) d'ester benzylique d'héparine (sel de sodium) et 540 ml d'eau distillée. Après homogénéisation à une température d'environ 20°C, on obtient une solution jaune pâle. Sous agitation magnétique, on prépare dans un
15 erlenmeyer B de 1 litre, une solution de 64,45 g (0,1438 mole) de chlorure de benzéthonium et de 450 ml d'eau. La solution de l'erlenmeyer B est coulée en environ 35 minutes dans la solution de l'erlenmeyer A sous agitation. On observe la formation d'un précipité blanc abondant. L'erlenmeyer B
20 est rincé avec 200 ml d'eau distillée et l'eau de lavage est introduite dans l'erlenmeyer A. L'agitation est alors arrêtée et on laisse déposer la suspension pendant 12 heures. Ce temps écoulé, on prélève et on écarte la partie limpide du surnageant. Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie),
25 on ajoute 560 ml d'eau et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité en 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (560 ml). Sur le précipité sédimenté, on renouvelle deux fois cette opération de lavage par environ 560 ml d'eau distillée. Dans la dernière
30 opération de lavage, on laisse le précipité en suspension et on filtre sur Verre fritté 3. Le gâteau est ensuite lavé par 4 fois 200 ml d'eau distillée. Le solide blanc humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on
35 obtient 87,5 g d'héparinate de benzyle, sel de benzéthonium. Le rendement obtenu est de 94,9 %.

Exemple B : DESCRIPTION DE L'HEXASACCHARIDE ATIII (Δ IIa-IIIs-

Is)



Spectre proton dans D₂O, 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 et 3,85 (6H, m), 3,87 (2H, m), 3,95 (1H, d, 8Hz), 4,03 (1H, d, 8Hz), entre 4,05 et 4,13 (4H, m), entre 4,16 et 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).

Sel de décasodium de l'acide 4-désoxy - α -L-thréo-hex-
 enepyranosyluronique-(1 $\rightarrow$ 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo-
 α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-acide β -D-glucopyranosyluronique-
 (1 $\rightarrow$ 4)-2-désoxy-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- α -D-
 glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-acide 2-O-sulfo- α -L-idopyrano-
 syluronique-(1 $\rightarrow$ 4)-2-desoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-
 glucopyranose.

. Les exemples 1 à 7 et 12 illustrent l'influence de la
 teneur en eau sur la sélectivité de la réaction de
 polymérisation et l'activité aXa et aIIa des produits
 obtenus.

. Les exemples 8 à 10 illustrent l'influence du nombre

d'équivalents de base sur l'activité aXa et aIIa du produit obtenu (avec une teneur en eau de 0,1%)

. L'exemple 11 illustre l'utilisation d'une autre base phosphazene que le 2-tert-butylimino-2-diethylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine :

Utilisation du tert-butylimino tri(pyrrolidino) phosphorane

EXEMPLE 1

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (0,1 % d'eau) :

Dans un erlenmeyer A, on introduit 70 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 10 g (0,006 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. La teneur en eau du milieu réactionnel est ajustée 0,1 %. La solution est chauffée à 40°C sous azote. Après dissolution complète, on revient à une température voisine de 20°C puis on ajoute 1,75 ml (0,006 mole) de 2-tert-butylimino-2-diethylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 30 g d'acétate de sodium anhydre dans 300 ml de méthanol. Après dissolution complète, on ajoute à la solution 5 g de célite Hyflo supercel. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé en 1 minute 30 secondes dans la solution méthanolique d'acétate de sodium à une température voisine de 5°C. Après 5 minutes d'agitation on laisse décanter la suspension pendant une heure 30 minutes. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (220 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 220 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 1 heure 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (250 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 250 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 100 ml de méthanol. Le solide humide jaune clair est essoré puis

séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 2,51 g d'héparine dépolymérisée sel de sodium dans la célite (5 g). Le rendement obtenu est de 64 %.

5

Saponification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 2,5 g (0,0038 mole) de l'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans la célite (5 g) obtenue précédemment et 17 ml d'eau. La suspension est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 2 fois 5 ml d'eau. Le filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer de 150 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 0,4 ml (0,004 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 5°C. Après addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 3 g de chlorure de sodium. Après dissolution on ajoute au milieu réactionnel 21 ml de méthanol. Après 15 minutes d'agitation on ajoute 44 ml de méthanol puis on agite pendant une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 45 minutes à une température voisine de 5°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (90 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 90 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (80 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 80 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 1,31 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 66 %.

35 **Purification :**

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 1,3 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 13 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation

magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à $9,7 \pm 0,1$. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane $0,45 \mu\text{m}$ et on ajoute $0,07 \text{ ml}$ d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une
5 température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par ajout d'HCl à 1 N, puis on ajoute 2 g de chlorure de sodium. La solution est ensuite filtrée sur membrane $0,45 \mu\text{m}$ puis on coule 14 ml de méthanol. La solution est ensuite refroidie à 10°C et agité pendant environ 15 minutes. On ajoute alors
10 36 ml de méthanol puis on agite une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 15 minutes environ. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (50 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse
15 re-sédimer le précipité 25 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (50 ml). Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une
20 température voisine de 40°C . Après 18 heures de séchage, on obtient $1,13 \text{ g}$ d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 87 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

- 25 Poids moléculaire moyen : 2600 Daltons
Activité anti-Xa : 177 UI/mg
Activité anti-IIa : 1,5 UI/mg
Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 118

30 **EXEMPLE 2**

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (0,2 %)

Dans un erlenmeyer A, on introduit 70 ml de dichlorométhane. Sous agitation et sous pression d'azote, on charge lentement 10 g ($0,006 \text{ mole}$) d'ester benzylique d'héparine
35 (taux d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. La teneur en eau du milieu réactionnel est ajustée à 0,2 %. Après dissolution complète, on ajoute $1,75 \text{ ml}$ ($0,006 \text{ mole}$) de 2-tert-butylimino-2-

diethylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine. On agite pendant 24 heures à une température voisine de 20°C. Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 30 g d'acétate de sodium anhydre dans 300 ml de méthanol. Après dissolution complète on ajoute à la solution 5 g de célite Hyflo supercel. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé en 1 minute 30 secondes dans la solution méthanolique d'acétate de sodium à une température voisine de 5°C. Après 5 minutes d'agitation on laisse décanter la suspension pendant 2 heures. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (220 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 220 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 2 heures environ. Le surnageant est prélevé et écarté (230 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 230 ml de méthanol. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 150 ml de méthanol. Le solide humide jaune clair est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 2,63 g d'héparine dépolymérisée brute dans la célite (5 g). Le rendement obtenu est de 67 %.

Saponification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 2,5 g (0,0038 mole) de l'héparine dépolymérisée sel de sodium dans la célite (5 g) obtenue précédemment et 18 ml d'eau. La suspension est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 2 fois 5 ml d'eau. Le filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer de 150 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 0,4 ml (0,004 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 5°C. Après addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 2 g de chlorure de sodium. On coule 14 ml de méthanol dans le mélange réactionnel. Après 15 minutes d'agitation on ajoute 36 ml de méthanol puis on agite pendant une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 45 minutes à une température voisine de

5°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (80 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 80 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est
5 ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 48 heures de séchage, on obtient 2,3 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 65 %.

10

Purification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 1,4 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 15 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation
15 magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à $9,7 \pm 0,1$. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 µm et on ajoute 0,07 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une température voisine de 40°C le mélange est refroidit à une
20 température voisine de 20°C puis neutralisé par ajout d'HCl 1N. on ajoute au milieu réactionnel 2 g de chlorure de sodium. La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45 µm puis on coule 14 ml de méthanol. La solution est ensuite refroidit à 10°C et agité 15 minutes. On ajoute alors 36 ml
25 de méthanol puis on agite une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 15 minutes. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (40 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 40 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On
30 laisse re-sédimenter le précipité 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (50 ml). Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite
35 (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 1,2 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 86 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi

obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2650 Daltons

Activité anti-Xa : 161 UI/mg

Activité anti-IIa : 1,4 UI/mg

5 Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 115

EXEMPLE 3

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (0,3 % d'eau)

10 Dans un erlenmeyer A, on introduit 70 ml de dichlorométhane. Sous agitation et sous pression d'azote, on charge 10 g (0,006 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. La teneur en eau du milieu

15 réactionnel est ajustée 0,3 %. Après dissolution complète, on ajoute 1,75 ml (0,006 mole) de 2-tert-butylimino-2-diethylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une

20 solution de 30 g d'acétate de sodium anhydre dans 300 ml de méthanol. Après dissolution complète, on ajoute à la solution 5 g de célite Hyflo supercel. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé en 1 minute 30 secondes dans la solution méthanolique d'acétate de sodium

25 à une température voisine de 5°C. Après 5 minutes d'agitation, on laisse décanter la suspension pendant 1 heure 10 minutes. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (220 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 220 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en

30 suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 100 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 2,57 g d'héparine dépolymérisée brute, sel de

35 sodium dans la célite (5 g). Le rendement obtenu est de 66 %.

Saponification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 2,5 g (0,0038

mole) de l'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans la célite (5 g) obtenue précédemment et 18 ml d'eau. La suspension est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 2 fois 5 ml d'eau. Le filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer 5 de 150 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 0,4 ml (0,004 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 5°C. Après addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 3 g de chlorure de sodium. On coule 15 ml de méthanol 10 dans le mélange réactionnel. Après 15 minutes d'agitation, on ajoute 36 ml de méthanol puis on agite pendant une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 1 heure. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (70 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 15 70 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 48 heures 20 de séchage, on obtient 1,42 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 62 %.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 1,4 g 25 d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 14 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à $9,7 \pm 0,1$. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 μm et on ajoute 0,07 ml d'une solution aqueuse de peroxyde 30 d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par ajout d'HCl 1N, puis on ajoute 2 g de chlorure de sodium. Après dissolution la solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45 μm puis on coule 14 ml de méthanol. Le filtrat 35 est ensuite refroidi à 10°C et agité 15 minutes. On ajoute alors 36 ml de méthanol puis on agite environ une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 40 minutes. Le surnageant est ensuite

prélevé puis écarté (50 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 25 minutes environ. Le précipité en suspension est ensuite
5 filtré sur verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 1,24 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le
10 rendement obtenu est de 89 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2400 Daltons

Activité anti-Xa : 132 UI/mg

15 Activité anti-IIa : 1,4 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 94

EXEMPLE 4

**Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (0,4 %
20 en eau) :**

Dans un erlenmeyer A, on introduit 70 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 10 g (0,006 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans
25 l'exemple A. La teneur en eau du milieu réactionnel est ajusté à 0,4 %. La solution est chauffée à 30°C sous azote. Après dissolution complète, on revient à une température voisine de 20°C puis on ajoute 1,75 ml (0,006 mole) de
30 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 30 g d'acétate de sodium anhydre dans 300 ml de méthanol. Après dissolution complète, on ajoute à la solution 5 g de célite Hyflo supercel. Sous
35 agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé en environ 1 minute 30 secondes dans la solution méthanolique d'acétate de sodium à une température voisine de 5°C. Après 5 minutes d'agitation, on laisse décanter la

suspension pendant 2 heures. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (80 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 80 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 1 heure environ. Le surnageant est prélevé et écarté (80 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 80 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 150 ml de méthanol. Le solide humide jaune clair est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 3,25 g d'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans la célite (5 g). Le rendement obtenu est de 83 %.

15 **Saponification :**

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 3,1 g (0,0018 mole) de l'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans la célite (10 g) obtenue précédemment et 21 ml d'eau. La suspension est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 2 fois 6 ml d'eau. Le filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer de 150 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 0,7 ml (0,007 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 5°C. Après addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 4 g de chlorure de sodium. On coule 28 ml de méthanol dans le mélange réactionnel. Après 15 minutes d'agitation, on ajoute 72 ml de méthanol puis on agite pendant une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 1 heure. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (90 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 90 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (90 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 90 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une

température voisine de 40°C. Après 48 heures de séchage, on obtient 1,9 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 67 %.

5 Purification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 1,9 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 19 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à 9,7 ± 0,1. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 µm et on ajoute 0,1 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par ajout d'HCl 1N, puis on ajoute 2 g de chlorure de sodium. La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45 µm puis on coule 14 ml de méthanol et on agite 15 minutes. On ajoute alors 36 ml de méthanol puis on agite une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 15 minutes. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (40 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 40 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (50 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 500 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 20 minutes environ. La suspension est ensuite filtrée sur verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 72 heures de séchage, on obtient 1,56 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 82 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2350 Daltons

35 Activité anti-Xa : 122 UI/mg

Activité anti-IIa : 1.3 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 94

EXEMPLE 5**Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (0,57 % d'eau) :**

Dans un erlenmeyer A, on introduit 140 ml de dichloro-
5 méthane. Sous agitation, on charge lentement 20 g (0,019
mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification :
75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple
A. La teneur en eau du milieu réactionnel est ajustée à
0,57 %. Après dissolution complète, on ajoute 3,5 ml (0,012
10 mole) de 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthyl-
perhydro-1,2,3-diaza-phosphorine. On agite à une température
voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce temps, on
prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 60 g d'acétate
de sodium anhydre dans 600 ml de méthanol. Après dissolution
15 complète, on ajoute à la solution 10 g de célite Hyflo
supercel. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel
de l'erlenmeyer A est coulé en 1 minute 30 secondes dans la
solution méthanolique d'acétate de sodium à une température
voisine de 4°C. Après 5 minutes d'agitation on laisse
20 décanter la suspension pendant 30 minutes. La partie limpide
du surnageant est prélevée et écartée (400 ml). Sur le
précipité sédimenté, on ajoute 400 ml de méthanol et on agite
pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 1
heure environ. Le surnageant est prélevé et écarté (420 ml).
25 Sur le précipité sédimenté, on ajoute 420 ml de méthanol et
on agite pendant 5 minutes. La suspension est ensuite filtré
sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par
200 ml de méthanol. Le solide humide jaune clair est essoré
puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température
30 voisine de 50°C. Après 18 heures de séchage, on obtient
6,66 g d'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans la
célite (10 g). Le rendement obtenu est de 85 %.

Saponification :

35 Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 6,66 g (0,0101
mole) de l'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans
la célite (10 g) obtenue précédemment et 47 ml d'eau. La
suspension est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 2 fois

15 ml d'eau. Le filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer de 150 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 1,1 ml (0,011 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 5°C. Après addition, le mélange est agité pendant 5 2 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 9,5 g de chlorure de sodium. On ajoute au milieu réactionnel 66 ml de méthanol. Après 15 minutes d'agitation, on ajoute 171 ml de méthanol puis on agite pendant une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la 10 suspension pendant 3/4 d'heure à une température voisine de 5°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (160 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 160 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et 15 écarté (180 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 180 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. La suspension est ensuite filtrée sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une 20 température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 4,53 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 74 %.

Purification :

25 Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 4,53 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 45 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à $9,7 \pm 0,1$. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 µm et 30 on ajoute 0,25 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par ajout d'HCl à 1 N, puis on ajoute 5,5 g de chlorure de sodium. La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45 µm 35 puis on coule 38 ml de méthanol à une température voisine de 10°C. La solution est ensuite amenée à 20°C et agité 15 minutes. On ajoute alors 100 ml de méthanol puis on agite une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter

la suspension pendant 20 minutes. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (90 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 90 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 25 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (100 ml). Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 50°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 3,7 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 82 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2200 Daltons

15 Activité anti-Xa : 120 UI/mg

Activité anti-IIa : 1.4 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 86

EXEMPLE 6

20 Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (1,8 % d'eau) :

Dans un erlenmeyer A, on introduit 140 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 20 g (0,019 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. La teneur en eau du milieu réactionnel est ajustée à 1,8 %. Après dissolution complète, on ajoute 3,5 ml (0,012 mole) de 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 60 g d'acétate de sodium anhydre dans 600 ml de méthanol. Après dissolution complète, on ajoute à la solution 10 g de célite Hyflo supercel. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé en 1 minute 30 secondes dans la solution méthanolique d'acétate de sodium à une température voisine de 4°C. Après 5 minutes d'agitation, on laisse décanter la suspension pendant 30 minutes. La

partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (400 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 400 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 1 heure environ. Le surnageant est
5 prélevé et écarté (420 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 420 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 200 ml de méthanol. Le solide humide jaune clair est essoré puis séché sous
10 pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 50°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 7,54 g d'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans la celite (10 g). Le rendement obtenu est de 96 %.

15 **Saponification :**

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 7,54 g (0,0101 mole) de l'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans la celite (10 g) obtenue précédemment et 53 ml d'eau. La solution est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 2 fois
20 15 ml d'eau. Le filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer de 150 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 1,25 ml (0,012 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 4°C. Après addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on
25 ajoute 10,5 g de chlorure de sodium. On ajoute au milieu réactionnel 70 ml de méthanol. Après 15 minutes d'agitation, on ajoute 190 ml de méthanol puis on agite pendant une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 3/4 d'heure à une température voisine de
30 4°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (180 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 180 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (180 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 180 ml
35 de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite

(6 kPa), à une température voisine de 50°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 5,53 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 80 %.

5 Purification :

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 5,53 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 55 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à 9,7 ± 0,1. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 µm et on ajoute 0,31 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par ajout d'HCl 1N, puis on ajoute 7 g de chlorure de sodium. La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45 µm puis on coule 49 ml de méthanol à une température voisine de 10°C. La solution est ensuite amenée à 20°C et agité 15 minutes. On ajoute alors 126 ml de méthanol puis on agite une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 20 minutes. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (105 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 105 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 25 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (110 ml). Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 55°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 4,53 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 82 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2600 Daltons

Activité anti-Xa : 105 UI/mg

35 Activité anti-IIa : 3.1 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 34

EXEMPLE 7

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (2,5 % d'eau) :

Dans un erlenmeyer A, on introduit 140 ml de
5 dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 20 g
(0,019 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux
d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme
décrit dans l'exemple A. La teneur en eau du milieu
réactionnel est ajustée à 2,5 %. Après dissolution complète,
10 on ajoute 3,5 ml (0,012 mole) de 2-tert-butylimino-2-
diethylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine. On
agite à une température voisine de 20°C, pendant 24 heures.
Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une
solution de 60 g d'acétate de sodium anhydre dans 600 ml de
15 méthanol. Après dissolution complète, on ajoute à la solution
10 g de célite Hyflo supercel. Sous agitation magnétique, le
mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé en 1 minute
30 secondes dans la solution méthanolique d'acétate de sodium
à une température voisine de 4°C. Après 5 minutes
20 d'agitation, on laisse décanter la suspension pendant 1
heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et
écartée (400 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute
400 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse
re-sédimenter le précipité 30 minutes environ. La partie
25 limpide du surnageant est prélevée et écartée (400 ml). Le
précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté
3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 200 ml de méthanol.
Le solide humide jaune clair est essoré puis séché sous
pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 50°C.
30 Après 18 heures de séchage, on obtient 7,78 g d'héparine
dépolymérisée brute, sel de sodium dans la célite (10 g). Le
rendement obtenu est de 99,6 %.

Saponification :

35 Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 7,78 g (0,0119
mole) de l'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans
la célite (10 g) obtenue précédemment et 79 ml d'eau. La
suspension est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 2 fois

15 ml d'eau. Le filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer de 150 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 1,3 ml (0,012 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 4°C. Après addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 10 g de chlorure de sodium. On ajoute au milieu réactionnel 60 ml de méthanol. Après 15 minutes d'agitation, on ajoute 190 ml de méthanol puis on agite pendant une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 3/4 d'heure à une température voisine de 4°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (180 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 180 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (180 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 180 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 50°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 5,87 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 82 %.

Purification :

25 Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 5,87 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 59 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à $9,7 \pm 0,1$. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 μm et on ajoute 0,34 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par ajout d'HCl à 1 N, puis on ajoute 7 g de chlorure de sodium. La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45 μm puis on coule 49 ml de méthanol à une température voisine de 10°C. La solution est ensuite amenée à 20°C et agité 15 minutes. On ajoute alors 126 ml de méthanol puis on agite une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la

suspension pendant 20 minutes. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (105 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 105 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 25 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (110 ml). Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 55°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 5,21 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 89 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 3550 Daltons

Activité anti-Xa : 99 UI/mg

Activité anti-IIa : 13,4 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 7.4

20 **EXEMPLE 8**

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (0,5 équivalents de base) :

Dans un erlenmeyer A, on introduit 140 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 20 g (0,019 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète à une température voisine de 30°C et retour à une température d'environ 20°C, on ajoute 1,75 ml (0,006 mole) de 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diazaphosphorine. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 60 g d'acétate de sodium anhydre dans 600 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium à une température voisine de 4°C. Après 1 heure d'agitation on laisse décanter la suspension pendant 2 heures. La partie limpide du

5 surnageant est prélevée et écartée (420 ml). Sur le précipité
sédimenté, on ajoute 420 ml de méthanol et on agite pendant
30 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 18 heures
environ. La partie limpide du surnageant est prélevée et
10 écartée (400 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute
400 ml de méthanol et on agite pendant 30 minutes. Le
surnageant est prélevé et écarté (400 ml). Le précipité en
suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau
obtenu est ensuite lavé par 2 fois 100 ml de méthanol. Le
10 solide humide jaune clair est essoré puis séché sous pression
réduite (6 kPa), à une température voisine de 60°C. Après
séchage, on obtient 5,7 g d'héparine dépolymérisée brute, sel
de sodium. Le rendement obtenu est de 73 %.

15 **Saponification :**

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 5,7 g (0,0086
mole) de l'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium
obtenue précédemment et 53 ml d'eau. Sous agitation
magnétique, on introduit 0,93 ml (0,009 mole) de lessive de
20 soude à 30 %, à une température voisine de 4°C. Après
addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On
neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 6 g de
chlorure de sodium. On ajoute au milieu réactionnel 42 ml de
méthanol. Après 15 minutes d'agitation on ajoute 108 ml de
25 méthanol puis on agite pendant 30 minutes. L'agitation est
alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant
30 minutes à une température voisine de 4°C. Le surnageant
est ensuite prélevé puis écarté (180 ml). Sur le précipité
sédimenté, on ajoute 180 ml de méthanol et on agite pendant 5
30 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 30 minutes
environ. Le surnageant est prélevé et écarté (170 ml). Sur le
précipité sédimenté, on ajoute 170 ml de méthanol et on agite
pendant 30 minutes. Le précipité en suspension est ensuite
filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé
35 par 2 fois 30 ml de méthanol. Le solide humide est essoré
puis séché sous pression réduite, à une température voisine
de 60°C. Après séchage, on obtient 3,5 g d'héparine
dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est

de 67,4 %.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 3,5 g
5 d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 35 ml
d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation
magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à 9,6 ±
0,1. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 µm et
on ajoute 0,18 ml d'une solution aqueuse de peroxyde
10 d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une
température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par
ajout d'HCl à 1N, puis on ajoute 3,6 g de chlorure de sodium.
La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45 µm puis on
coule 27 ml de méthanol à une température voisine de 10°C. La
15 solution est ensuite amenée à 20°C et agité 15 minutes. On
ajoute alors 65 ml de méthanol puis on agite 30 minutes.
L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la
suspension pendant 30 minutes. Le surnageant est ensuite
prélevé puis écarté (80 ml). Sur le précipité sédimenté, on
20 ajoute 80 ml de méthanol et on agite pendant 30 minutes. On
laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le
surnageant est prélevé et écarté (70 ml). Sur le précipité
sédimenté, on ajoute 70 ml de méthanol et on agite pendant 30
minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur
25 verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2
fois 30 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis
séché sous pression réduite, à une température voisine de
60°C. Après séchage, on obtient 2,8 g d'héparine
dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est
30 de 80 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi
obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2900 Daltons

Activité anti-Xa : 146,1 UI/mg

35 Activité anti-IIa : 5,1 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 28,6

EXEMPLE 9

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (0,6 équivalents de base) :

Dans un tricol A, on introduit 280 ml de dichloro-méthane. Sous agitation, on charge lentement 40 g (0,024 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète à une température voisine de 30°C et retour à une température voisine de 20°C, on ajoute 4,2 ml (0,014 mole) de 2-tert-butyldimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 60 g d'acétate de sodium anhydre dans 600 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, la moitié du mélange réactionnel du tricol A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium à une température voisine de 4°C. Après 1 heure d'agitation on laisse décanter la suspension. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (310 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 310 ml de méthanol et on agite pendant 1 heure. On laisse re-sédimenter le précipité 18 heures environ. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (400 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 400 ml de méthanol et on agite pendant 1 heure. Le surnageant est prélevé et écarté (300 ml). Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 100 ml de méthanol. Le solide humide jaune clair est essoré puis séché sous pression réduite, à une température voisine de 60°C. Après séchage, on obtient 6 g d'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium. Le rendement obtenu est de 77 %.

Saponification :

Dans un erlenmeyer de 250 ml, on introduit 6 g (0,0091 mole) de l'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) obtenue précédemment et 56 ml d'eau. Sous agitation magnétique, on introduit 1 ml (0,010 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 4°C. Après addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On

36

neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 6,4 g de chlorure de sodium. On ajoute au milieu réactionnel 45 ml de méthanol. Après 15 minutes d'agitation on ajoute 115 ml de méthanol puis on agite pendant 30 minutes. L'agitation est
5 alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 30 minutes à une température voisine de 4°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (170 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 170 ml de méthanol et on agite pendant 30 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes
10 environ. Le surnageant est prélevé et écarté (140 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 140 ml de méthanol et on agite pendant 30 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 30 ml de méthanol. Le solide humide est essoré
15 puis séché sous pression réduite, à une température voisine de 60°C. Après séchage, on obtient 3,6 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 65,3 %.

20 **Purification :**

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 3,5 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 35 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à 9,6 ±
25 0,1. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 µm et on ajoute 0,18 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une température voisine de 20°C, le mélange est neutralisé par ajout d'HCl à 1N, puis on ajoute 3,5 g de chlorure de sodium.
30 La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45 µm puis on coule 25 ml de méthanol à une température voisine de 10°C. La solution est ensuite amenée à 20°C et agité 15 minutes. On ajoute alors 63 ml de méthanol puis on agite 30 minutes. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la
35 suspension pendant 30 minutes. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (70 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 70 ml de méthanol et on agite pendant 30 minutes. On laisse re-sédimer le précipité quelques minutes. La

suspension est ensuite filtrée sur verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2 fois 30 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite, à une température voisine de 60°C. Après séchage, on obtient 5 2,5 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 71,4 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2600 Daltons

10 Activité anti-Xa : 150,5 UI/mg

Activité anti-IIa : 3,2 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 47

EXEMPLE 10

15 Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (0,8 équivalents de base) :

Dans un erlenmeyer A, on introduit 70 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 10 g (0,006 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit 20 dans l'exemple A. Après dissolution complète à une température voisine de 30°C et retour à une température voisine de 20°C, on ajoute 1,38 ml (0,004 mole) de 2-tert-butylimino-2-diethylamino-1,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza- 25 phosphorine. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 30 g d'acétate de sodium anhydre dans 300 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé en 1 30 minute 15 secondes dans la solution méthanolique d'acétate de sodium à une température voisine de 4°C. Après 5 minutes d'agitation, on laisse décanter la suspension pendant 1 heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (190 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 35 190 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (190 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 190 ml de méthanol et on

agite pendant 30 minutes. Le surnageant est prélevé et écarté (190 ml). Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 150 ml de méthanol. Le solide humide jaune clair est essoré puis
5 séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 3,05 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 80 %.

10 **Saponification :**

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 3,05 g (0,0048 mole) de l'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) obtenue précédemment et 21 ml d'eau. La solution est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 2 fois 6 ml d'eau. Le
15 filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer de 150 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 0,6 ml (0,006 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 4°C. Après addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 4 g de
20 chlorure de sodium. On ajoute au milieu réactionnel 28 ml de méthanol. Après 15 minutes d'agitation on ajoute 72 ml de méthanol puis on agite pendant 1 heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 30 minutes à une température voisine de 4°C. Le surnageant est
25 ensuite prélevé puis écarté (80 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 80 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (80 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 80 ml de méthanol et on agite
30 pendant 30 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après séchage, on obtient 1,6 g d'héparine
35 dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 57 %.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 1,6 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 16 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à 9,6 ± 0,1. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 µm et on ajoute 0,08 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par ajout d'HCl à 1 N, puis on ajoute 2 g de chlorure de sodium. La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45 µm puis on coule 14 ml de méthanol à une température voisine de 10°C. La solution est ensuite amenée à 20°C et agité 15 minutes. On ajoute alors 36 ml de méthanol puis on agite 1 heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 30 minutes. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (50 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (50 ml). Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après séchage, on obtient 1,25 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 78 %.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2400 Daltons

Activité anti-Xa : 154,3 UI/mg

Activité anti-IIa : 1,6 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 96,4

EXEMPLE 11

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un erlenmeyer A, on introduit 140 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 20 g (0,019 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 75 %, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète à une

température voisine de 40°C et retour à une température voisine de 20°C, on ajoute 3,5 ml (0,011 mole) de tert-butylimino-tri(pyrrolidino)phosphorane. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce
5 temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 60 g d'acétate de sodium anhydre dans 600 ml de méthanol. Après dissolution complète on ajoute à la solution 10 g de célite Hyflo supercel. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé en 1 minute 30
10 secondes dans la solution méthanolique d'acétate de sodium à une température voisine de 4°C. Après 5 minutes d'agitation on laisse décanter la suspension pendant 30 minutes. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (400 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 400 ml de
15 méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 1 heure 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (250 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 250 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur
20 verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 200 ml de méthanol. Le solide humide jaune clair est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après séchage, on obtient 5,39 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement
25 obtenu est de 69 %.

Saponification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 5 g (0,0076 mole) de l'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de
30 sodium) obtenue précédemment et 35 ml d'eau. La solution est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 2 fois 10 ml d'eau. Le filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer de 250 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 1 ml (0,01 mole) de lessive de soude à 30 %, à une température voisine de 4°C.
35 Après addition, le mélange est agité pendant 2 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 6 g de chlorure de sodium. On ajoute au milieu réactionnel 42 ml de méthanol. Après 15 minutes d'agitation on ajoute 104 ml de

méthanol puis on agite pendant 15 minutes. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 1 heure à une température voisine de 4°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (140 ml). Sur le précipité
5 sédimenté, on ajoute 140 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 45 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (160 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 160 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. Le précipité en suspension est ensuite
10 filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 100 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 48 heures de séchage, on obtient 2,7 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement
15 obtenu est de 59 %.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 2,6 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 25 ml
20 d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à $9,7 \pm 0,1$. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 µm et on ajoute 0,15 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Après environ 2 heures d'agitation, à une
25 température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par ajout d'HCl 1N, puis on ajoute 3 g de chlorure de sodium. La solution est ensuite filtrée sur membrane 0,45µm puis on coule 21 ml de méthanol à une température voisine de 10°C. La solution est ensuite amenée à 20°C et agité 15 minutes. On
30 ajoute alors 54 ml de méthanol puis on agite une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 20 minutes. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (50 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On
35 laisse re-sédimer le précipité 20 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (50 ml). Le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 50 ml de méthanol. Le

solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 2,35 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 90 %.

5 Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2400 Daltons

Activité anti-Xa : 167,5 UI/mg

Activité anti-IIa : 1,1 UI/mg

10 Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 152

EXEMPLE 12

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium (0, 05 % d'eau) :

15 Dans un erlenmeyer, on introduit 140 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 20 g (0,019 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 75%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. On ajoute 20 g de tamis moléculaires 4 A au milieu réactionnel et la

20 teneur en eau est amenée à 0,05% en agitant lentement pendant 48h . Le surnageant est transféré sous atmosphère inerte dans un erlenmeyer A. Après dissolution complète, on ajoute 3,5 ml (0,012 mole) de 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1 ,3-diméthylperhydro-1,2,3-diaza-phosphorine. On agite à une

25 température voisine de 20°C, pendant 24 heures. Pendant ce temps, on prépare dans un erlenmeyer B, une solution de 60 g d'acétate de sodium anhydre dans 600 ml de méthanol. Après dissolution complète, on ajoute à la solution 10 g de célite Hyflo supercel. Sous agitation magnétique, le mélange

30 réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé en environ 2 minutes dans la solution méthanolique d'acétate de sodium à une température voisine de 4°C. Après 15 minutes d'agitation on laisse décanter la suspension pendant 1 heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (420 ml). Sur

35 le précipité sédimenté, on ajoute 420 ml de méthanol et on agite pendant 15 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 1 heure environ. Le surnageant est prélevé et écarté (450 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 450 ml

de méthanol et on agite pendant 15 minutes. La suspension est ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 200 ml de méthanol. Le solide humide jaune clair est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 50°C. Après 16 heures de séchage, on obtient 5,36 g d'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans la célite (10 g). Le rendement obtenu est de 68,6 %.

Saponification :

10 Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 5,36 g (0,00817 mole) de l'héparine dépolymérisée brute, sel de sodium dans la célite (10 g) obtenue précédemment et 50 ml d'eau. La suspension est filtrée sur verre fritté 3 et rincé par 4 fois 15 ml d'eau. Le filtrat obtenu est chargé dans un erlenmeyer 15 de 150 ml. Sous agitation magnétique, on introduit 1,01 ml (0,0122 mole) de lessive de soude à 35%, à une température voisine de 4°C. Après addition, le mélange est agité pendant 3 heures. On neutralise la solution par ajout d'HCl 1N et on ajoute 11 g de chlorure de sodium. On ajoute au milieu 20 réactionnel 77 ml de méthanol. Après 15 minutes d'agitation, on ajoute 200 ml de méthanol puis on agite pendant une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 1 heure à une température voisine de 4°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (240 ml). Sur 25 le précipité sédimenté, on ajoute 240 ml de méthanol et on agite pendant 10 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (225 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 225 ml de méthanol et on agite pendant 10 minutes. La suspension est 30 ensuite filtré sur verre fritté 3. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 40°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 2,65 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de 35 sodium). Le rendement obtenu est de 53,7 %.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 2,65 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 26,5 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude 1N, on porte le pH à $9,7 \pm 0.1$. Le milieu réactionnel est filtré sur membrane 0,45 μm et on ajoute 0,25 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après environ 2 heures d'agitation, à une température voisine de 20°C le mélange est neutralisé par ajout d'HCl à 1 N, puis on ajoute 3 g de chlorure de sodium. La solution est ensuite filtrée sur membrane 0.45 μm puis on coule 21 ml de méthanol à une température voisine de 10°C. La solution est ensuite amenée à 20°C et agité 15 minutes. On ajoute alors 54 ml de méthanol puis on agite une heure. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 45 minutes. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (46 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 46 ml de méthanol et on agite pendant 5 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (50 ml). 50 ml de méthanol sont ajoutés et le précipité en suspension est ensuite filtré sur verre fritté 4. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2 portions de 10 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (6 kPa), à une température voisine de 50°C. Après 18 heures de séchage, on obtient 2,363 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 89,1%.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2500 Daltons

Activité anti-Xa : 192 UI/mg

Activité anti-IIa : 1,3 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 148

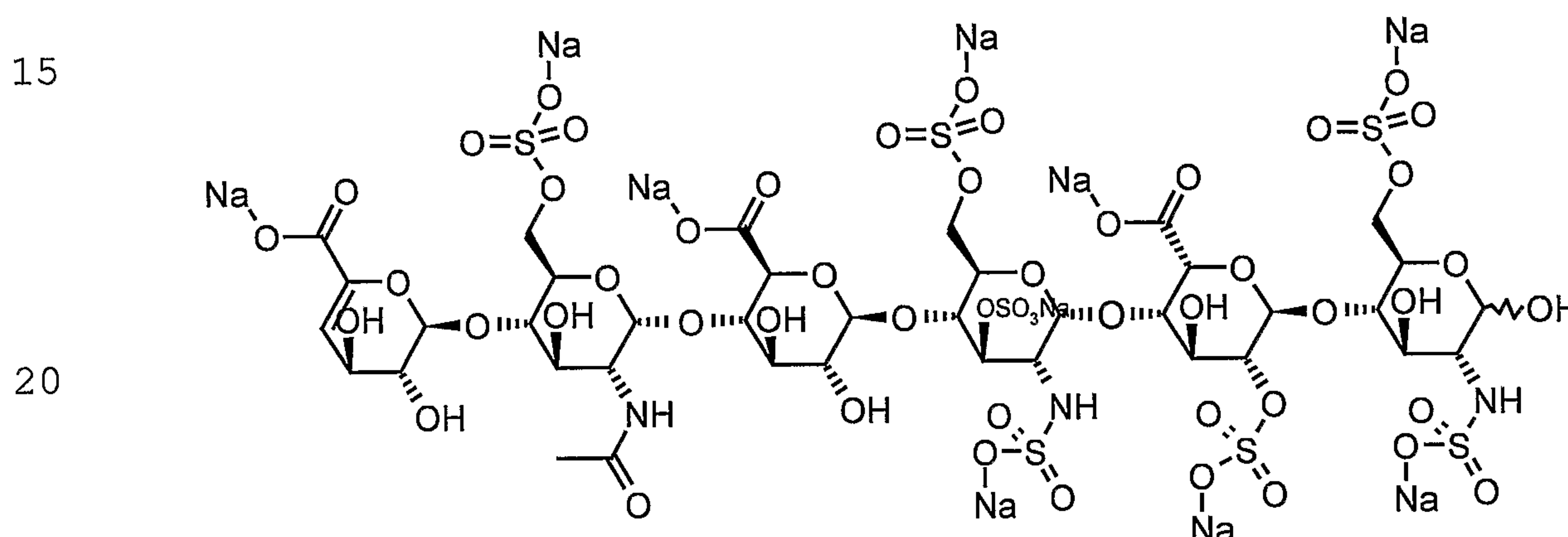
REVENDICATIONS

1) Mélanges d'oligosaccharides sulfatés possédant la structure générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine et présentant les caractéristiques suivantes :

- 5 - ils ont un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 daltons, une activité anti-Xa de 120 à 200 UI/mg, une activité anti-IIa inférieure à 10 UI/mg et un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 30,

les oligosaccharides constitutifs des mélanges

- 10 - contiennent 2 à 26 motifs saccharidiques,
 - ont un motif acide uronique-4,5 insaturé 2-O-sulfate à l'une de leurs extrémités,
 - contiennent l'hexasaccharide Δ IIa-II $\underline{s}$ -Is de formule :

 Δ IIaII $\underline{s}$

Is

25

et sont sous forme d'un sel de métal alcalin ou alcalinoterreux.

- 2)** Mélange d'oligosaccharides selon la revendication 1 caractérisé en ce que le sel de métal alcalin ou
 30 alcalinoterreux, est choisi parmi les sels de sodium, potassium, calcium et magnésium

3) Mélange d'oligosaccharides selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il contient une fraction hexasaccharide représentant de 15 à 25 % du mélange d'oligosaccharides.

- 35 **4)** Mélange d'oligosaccharides selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il contient de 8 à 15 % de l'hexasaccharide Δ IIa-II $\underline{s}$ -Is dans la fraction hexasaccharide du mélange d'oligosaccharides.

5) Mélange d'oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il présente une activité anti-Xa comprise entre 150 UI/mg et 200 UI/mg.

6) Mélange d'oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'il a activité anti-IIa inférieure à 5 UI/mg et en particulier de 0,5 à 3,5 UI/mg.

7) Mélange d'oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il présente un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 50 et notamment supérieur à 100.

8) Mélange d'oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce qu'il a un poids moléculaire moyen compris entre 2000 et 3000 Daltons et en particulier de 2400 à 2650 Da.

9) Mélange d'oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il présente une activité anti Xa comprise entre 150 et 200 UI/mg, une activité Anti-IIa comprise entre 0,5 et 3,5 UI/mg, et un poids moléculaire moyen compris entre 2400 et 2650 Da.

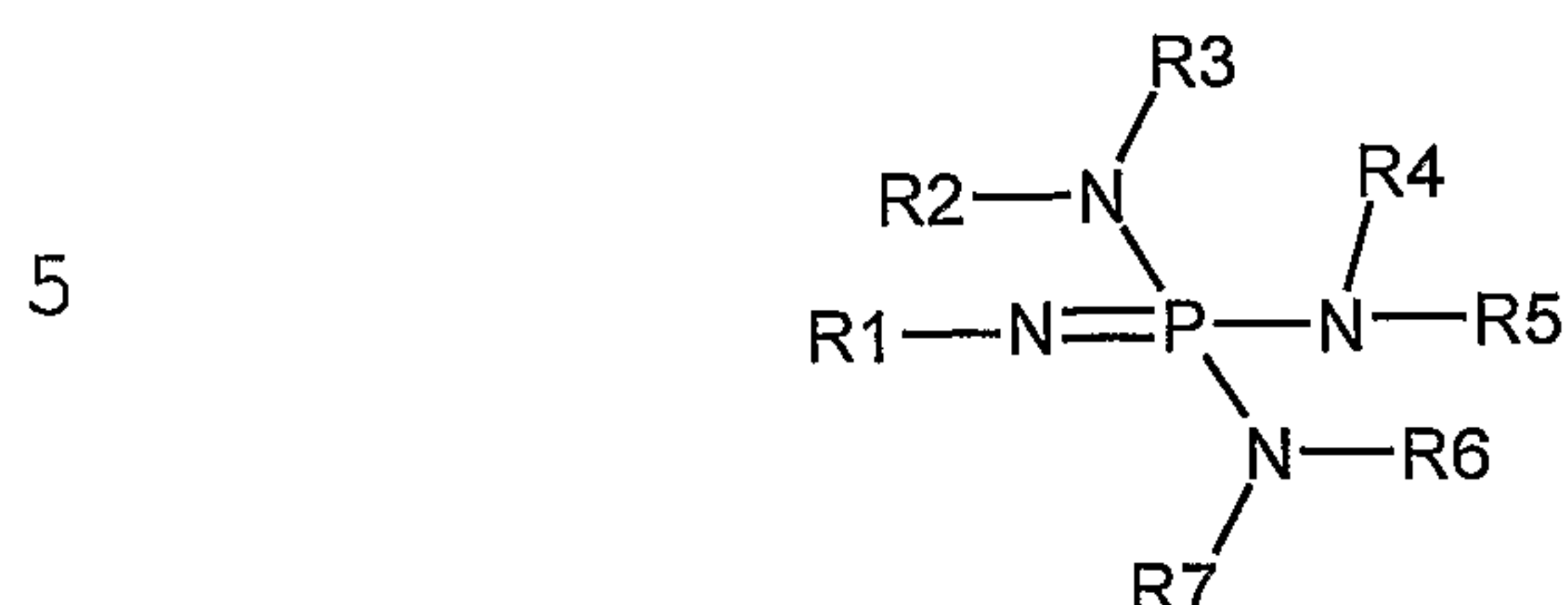
10) Procédé de préparation de mélanges d'oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 au cours duquel on dépolymérise le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine en milieu organique en présence d'une base organique forte de pKa supérieur à 20 caractérisé en ce que la base organique utilisée consiste en la famille des phosphazènes, notamment en solution dichlorométhane, renferme un pourcentage d'eau inférieur à 0,6 %.

11) Procédé de préparation selon la revendication 10 de mélanges d'oligosaccharides selon la revendication 1, caractérisé en ce que la teneur en eau est inférieure à 0,3 % et de préférence inférieure à 0,2 %.

12) Procédé de préparation selon les revendications 10 ou 11 caractérisé en ce que le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est le sel de benzéthonium, de cétypyridinium ou de cétyltriméthyl ammonium.

13) Procédé de préparation selon les revendications 10 ou 11

caractérisé en ce que les bases de la famille des phosphazènes sont, celles de formule :



10 dans laquelle les radicaux R_1 à R_7 sont identiques ou différents et représentent des radicaux alkyle linéaire ou ramifié renfermant de 1 à 6 atomes de carbone.

14) Procédé de préparation selon les revendications 10 ou 11 caractérisé en ce que le rapport en mole base forte/ester est
15 compris entre 0,2 et 5 et, de préférence, entre 0,6 et 2.

15) Procédé de préparation d'oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 à partir des héparines dans lequel on effectue les opérations suivantes :

- a) Transalification de l'héparine de sodium par action de
20 chlorure de benzéthonium,
- b) Estérification de l'héparinate de benzéthonium obtenu par action de chlorure de benzyle,
- c) Transalification de l'ester benzylique obtenu et obtention du sel d'ammonium quaternaire,
- 25 d) Dépolymérisation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine par la méthode telle que définie à la revendication 10 ou 11,
- e) Transformation du sel d'ammonium quaternaire en sel de sodium,
- 30 f) Eventuellement saponification de l'héparine par action d'une base telle que la soude,
- g) Eventuellement purification notamment par action d'un agent d'oxydation tel que l'eau oxygénée.

16) Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que
35 la réaction de l'étape a) est réalisée par action du chlorure de benzéthonium en excès, sur l'héparine sodique, à une température voisine de 15 à 25°C. avec un rapport molaire sel/héparine sodique compris entre 3 et 4.

17) Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que l'estérification de l'étape b) s'effectue au sein d'un solvant organique chloré tel que le chloroforme ou le chlorure de méthylène, à une température comprise entre 25 et 45°C et, de préférence entre 30 et 40°C et l'ester sous forme de sel de sodium est ensuite récupéré par précipitation au moyen d'acétate de sodium à 10 % en poids dans un alcool tel que le méthanol à raison d'1 à 1,2 volume d'alcool par volume de milieu réactionnel.

18) Procédé selon la revendication 15 ou 17 caractérisé en ce que le taux d'estérification du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 50 et 100 % et, de préférence, entre 70 et 90 %.

19) Procédé selon la revendication 15, 17 ou 18 caractérisé en ce qu'on utilise de 0,5 à 1,5 parties en poids du chlorure de benzyle pour 1 partie en poids du sel de benzéthonium de l'héparine avec un temps de réaction qui sera compris entre 10 et 35 h.

20) Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce la transalification de l'étape c) s'effectue au moyen d'un chlorure d'ammonium quaternaire et, de préférence, au moyen de chlorure de benzéthonium, de chlorure de cétylpyridinium ou de chlorure de cétyltriméthyl ammonium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 10 et 25°C.

21) Procédé selon la revendication 20 caractérisé en ce que le rapport en mole chlorure d'ammonium quaternaire/sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 2 et 3

22) Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que la transformation en sel de sodium du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée (étape e) est effectué par traitement du milieu réactionnel avec une solution alcoolique d'acétate de sodium et, de préférence avec une solution à 10 % d'acétate de sodium dans le méthanol (poids/volume), à une température comprise entre 15 et 25°C.

23) Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que la saponification (étape f) s'effectue au moyen d'un

hydroxyde de métal alcalin tel que la soude, la potasse, l'hydroxyde de lithium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 0 et 20°C et de préférence 0 et 10°C.

24) Procédé selon la revendication 23 caractérisé en ce qu'on
5 utilise de 1 à 5 équivalents molaires d'hydroxyde de métal alcalin et de préférence de 1 à 2 équivalents molaires d'hydroxyde de sodium.

25) Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'on purifie (étape g) au moyen de peroxyde d'hydrogène, en milieu
10 aqueux, à une température de 10 à 50°C et de préférence entre 20 et 40°C.

26) A titre de médicament les oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 9

27) A titre de médicament ayant une activité antithrombotique
15 les oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 9

28) Médicaments selon les revendications 26 ou 27 pour la prévention ou le traitement des thromboses veineuses et artérielles, de la thrombose veineuse profonde, de l'embolie
20 pulmonaire, de l'angor instable, de l'infarctus du myocarde, de l'ischémie cardiaque, des maladies occlusives des artères périphériques, de la fibrillation auriculaire, de la prolifération des cellules musculaires lisses, de l'athérosclérose et l'artériosclérose, du cancer par la
25 modulation de l'angiogénèse et des facteurs de croissance, et des désordres diabétiques tel que les rétinopathies et néphropathies diabétiques

29) Compositions pharmaceutiques renfermant au moins un médicament tel que défini à la revendication 26 et un ou
30 plusieurs excipients ou véhicules ou additifs pharmaceutiquement inertes.

30) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 29 caractérisée en ce qu'elles consistent en solutions injectables par voie sous-cutanée ou intraveineuse.

31) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 29
35 caractérisée en ce qu'elles consistent en une formulation par inhalation destinée à la voie pulmonaire.

32) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 29 caractérisée en ce qu'elles consistent en une formulation pour une administration destinée à la voie orale.

33) Mélanges de polysaccharides tels que définis à l'une
5 quelconque des revendication 1 à 9 susceptible d'être obtenu par le procédé tel que défini à la revendication 15.