(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101812190 A
(43)申请公布日 2010.08.25

(21)申请号 201010147549.5

(22)申请日 2003.10.08

(30)优先权数据
0212584 2002.10.10 FR

(62)分案原申请数据
200380100992.5 2003.10.08

(71)申请人 安万特医药股份有限公司
地址 法国安东尼

(72)发明人 V·比贝尔罗维科 L·格龙达尔
P·穆里耶 C·维斯科夫

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.
C08L 5/10(2006.01)
C08B 37/10(2006.01)
A61P 7/02(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 9/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 23 页

(54)发明名称

由肝素衍生的多糖混合物、其制备方法以及含有它们的药物组合物

(57)摘要

本发明涉及由肝素衍生的多糖混合物，它们的平均分子量是1500-3000道尔顿，抗Xa活性/抗IIa活性的比大于30。本发明还涉及它们的制备方法和含有它们的药物组合物。

CN 101812190 A

1. 硫酸化低聚糖混合物，它们具有组成肝素的多糖的一般结构，还具有下述特征：

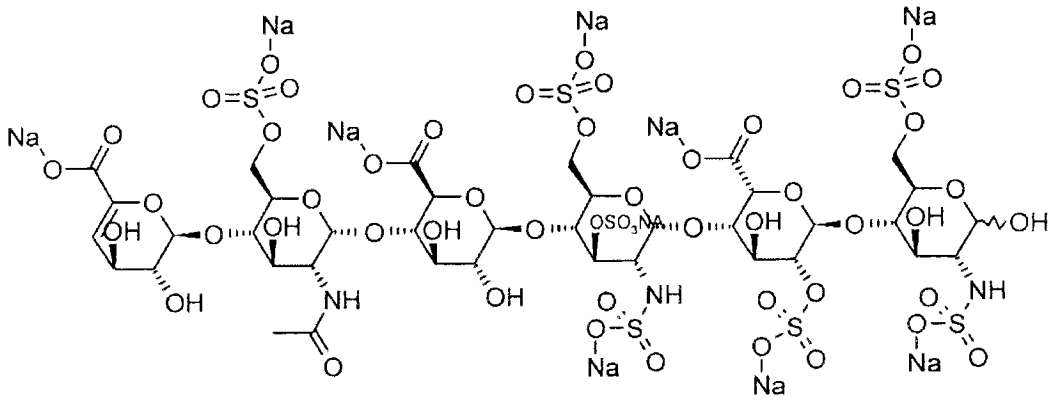
- 它们的平均分子量是 1500-3000 道尔顿，抗 Xa 活性是 120-200IU/mg，抗 IIa 活性小于 10IU/mg，抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性的比大于 30，

这些混合物的组分低聚糖：

- 含有 2-26 个糖单元，

- 在其中一个末端有 4,5- 不饱和糖醛酸 2-O- 硫酸酯单元，

- 含有下式的六糖 ΔIIa-IIs-Is：



ΔIIa　　IIs　　Is

并且这些低聚糖混合物呈碱金属或碱土金属盐形式。

2. 根据权利要求所述 1 的低聚糖混合物，其特征在于碱金属或碱土金属盐选自钠、钾、钙和镁盐。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的低聚糖混合物，其特征在于它含有六糖馏分，这种馏分占低聚糖混合物的 15-25%。

4. 根据权利要求 3 所述的低聚糖混合物，其特征在于在低聚糖混合物的六糖馏分中，含有 8-15%的六糖 ΔIIa-IIs-Is。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项权利要求所述的低聚糖混合物，其特征在于它的抗 Xa 活性是 150-200IU/mg。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项权利要求所述的低聚糖混合物，其特征在于它的抗 IIa 活性小于 5IU/mg，特别是 0.5-3.5IU/mg。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项权利要求所述的低聚糖混合物，其特征在于它的抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比大于 50，特别是大于 100。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项权利要求所述的低聚糖混合物，其特征在于它的平均分子量是 2000-3000 道尔顿，特别是 2400-2650 道尔顿。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项权利要求所述的低聚糖混合物，其特征在于它的抗 Xa 活性是 150-200IU/mg，抗 IIa 活性是 0.5-3.5IU/mg，而平均分子量是 2400-2650 道尔顿。

由肝素衍生的多糖混合物、其制备方法以及含有它们的药物组合物

[0001] 本申请为2003年10月8日提交的发明名称为“由肝素衍生的多糖混合物、其制备方法以及含有它们的药物组合物”的PCT申请PCT/FR2003/002960的分案申请，所述PCT申请进入中国国家阶段的日期为2005年4月6日，申请号为200380100992.5。

[0002] 本发明涉及由肝素衍生得到的多糖混合物、它们的制备方法以及含有它们的药物组合物。

[0003] 肝素是一种动物源的硫酸化粘多糖混合物，这种混合物主要因其抗凝血和抗血栓形成性能而得到应用。

[0004] 然而，肝素本身的缺陷制约着其应用。特别是它的高抗凝血活性（抗IIa活性）可能引起出血。

[0005] 人们曾提出通过肝素酯的碱解聚作用来得到低分子量肝素(EP40144)；但是，这些产物还是具有高的抗IIa活性。

[0006] 在US 6 384 021中，也曾描述过极低分子量的肝素。然而，在其中的实施例中测得的抗Xa活性都没有超过120IU，并且测得的抗Xa/抗IIa比是15-50。

[0007] 在WO 0208295中，采用与US 6384021不同的方法制备出极低分子量的肝素，这些肝素的活性是100-150IU，并且在一些应用实施例中测定的抗Xa/抗IIa比也是非常高的。

[0008] 尽管如此，人们仍需要提高这类药物的抗Xa活性，尤其是使其活性达到150IU/mg以上，以及提高抗Xa/抗IIa比，因此，需要研制新的肝素衍生物制备方法。

[0009] 因此，本发明的一个目的是通过改进现有技术中描述的方法、特别是通过控制这种解聚步骤时的水百分数，从而来提高抗Xa活性与抗Xa/抗IIa比。由此得到的肝素具有极好的抗血栓形成活性，其抗Xa活性也与肝素的抗Xa活性相近，同时还减少了出血危险性，而且抗IIa活性也非常低。同时，本发明产品的半衰期显著高于肝素的半衰期。

[0010] 因此，本发明的目的是一些由肝素衍生得到的新多糖混合物，它们对活化因子X(因子Xa)和活化因子II(因子IIa)的选择性活性优于肝素。

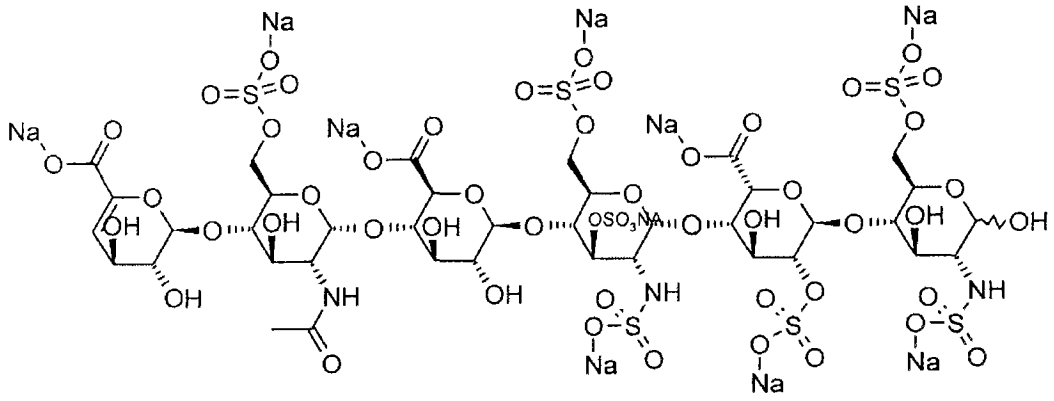
[0011] 应该理解到，可以将平均分子量1500-3000道尔顿的多糖混合物称之低聚糖。

[0012] 因此，本发明的目的是这些硫酸化低聚糖混合物，它们具有组成肝素的多糖的一般结构，还具有下述特征：

[0013] -它们的平均分子量是1500-3000道尔顿，抗Xa活性是120-200IU/mg，抗IIa活性小于10IU/mg，抗Xa活性/抗IIa活性的比大于30，

[0014] -组成这些混合物的低聚糖含有2-26个糖单元，在一个末端有4,5-不饱和糖醛酸2-O-硫酸酯单元，并且含有下式的六糖 ΔIIa-IIs-Is：

[0015]



ΔIIa IIs Is

[0016] 在本发明描述的低聚糖混合物中含有的六糖 ΔIIa-IIs-Is 是一种对 ATIII 具有高亲合性的序列，其特征在于抗 Xa 活性高于 740U/mg。

[0017] 本发明中描述的低聚糖混合物呈碱金属或碱土金属盐形式。

[0018] 对于碱金属或碱土金属盐，优选钠、钾、钙和镁盐。

[0019] 可以采用高压液相色谱法，使用串联双柱，例如以商品名 TSK G3000 XL 和 FSK G2000 XL 销售的高压液相色谱仪，测定平均分子量。采用折光计进行检测。使用的洗脱剂是硝酸锂，流速是 0.6ml/min。采用琼脂糖 - 聚丙烯酰胺凝胶层析法 (IBF) 分馏依诺肝素 (AVENTIS) 制得的标准品校正这种系统。根据 Barrowcliffe 等人，《Thromb. Res.》，12，27-36(1977-78) 或 D. A. Lane 等人，《Thromb. Res.》，12，257-271(1977-78) 描述的方法进行制备。采用 GPC6 软件 (Perkin Elmer) 计算这些结果。

[0020] 根据 Teien 等人，《Thromb. Res.》，10，399-410(1977) 描述的发色底物酰胺解方法，使用低分子量肝素的第一个国际标准作为标准测定了抗 Xa 活性。

[0021] 采用 Anderson L. O. 等人，《Thromb. Res.》，15，531-541(1979) 描述的技术，使用低分子量肝素的第一个国际标准作为标准测定了抗 IIa 活性。

[0022] 优选六糖馏分占低聚糖混合物的 15-25％。

[0023] 优选在低聚糖混合物的六糖馏分中，本发明的混合物含有 8-15％六糖 ΔIIa-IIs-Is。

[0024] 采用高压液相层析法，使用 TSK G3000 XL 和 TSK G2000 XL 柱，或者通过制备性分离六糖馏分，可以分析测定六糖馏分的百分数。在这种情况下，使用聚丙烯酰胺琼脂糖类凝胶填充柱，例如从市场上购买商标 Ultrogel ACA202^{R}(Biosepra) 的填充柱，对这种混合物进行层析分离。用碳酸氢钠溶液洗脱这种混合物。优选地，这种碳酸氢钠溶液是 0.1-1mol/1 溶液。更优选地，用浓度 1mol/1 的碳酸氢钠溶液进行这种分离。采用 UV 光谱法 (254nm) 进行检测。分馏后，六糖馏分的碳酸氢钠溶液用冰乙酸进行中和。这种溶液然后在减压下浓缩达到乙酸钠浓度高于 30 重量％。然后加入 3-5 个体积的甲醇沉淀该六糖馏分。这种六糖馏分再使用 3 号烧结玻璃过滤器进行过滤回收。得到的六糖混合物可以采用 HPLC(高效液相色谱) 进行分析，测定六糖 ΔIIa-IIs-Is 的含量。根据本技术领域的技术人员采用的技术 (M. Hook, I. Bjork, J. Hopwood and U. Lindahl,《F. E. B. Sletters》, vol 656(1)(1976))，采用制备性 HPLC 色谱法或采用亲合色谱法，使用抗凝血酶 III 琼脂糖柱，可以分

离六糖 ΔIIa-IIs-Is。

[0025] 特别优选本发明的混合物的抗 Xa 活性是 150-200IU/mg。

[0026] 优选本发明的混合物的抗 IIa 活性小于 5IU/mg，特别优选是 0.5-3.5IU/mg。下面描述的这些应用实施例证明当采用该方法优选特征时，本发明的混合物的抗 IIa 活性是 1.1-1.6IU/mg。

[0027] 优选这些混合物的抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比高于 50，特别优选高于 100。

[0028] 优选本发明混合物的平均分子量是 2000-3000 道尔顿，特别优选平均分子量是 2400-2650 道尔顿。

[0029] 因此，本发明的目的非常特别地是如前面定义的这些混合物，其抗 Xa 活性是 150-200IU/mg，抗 IIa 活性是 0.5-3.5IU/mg，平均分子量是 2400-2650 道尔顿。

[0030] 优选地使用 pKa 大于 20 的强有机碱（优选地具有类似于例如根据 R. Schwesinger 等 人，《Angew. Chem. Int. Ed. Engl.》26，1167-1169(1987)，R. Schwesinger 等 人，《Angew. Chem.》105，1420(1993) 定义的膦腈类的性质），在有机介质中，通过肝素苄酯季铵盐的解聚作用，再将解聚的肝素苄酯季铵盐转化成钠盐，这些残留酯进行皂化和任选地纯化，这样可以制备出本发明的低聚糖混合物。本发明方法重复了如在 WO 0208295 中所述方法的主要步骤，同时增加一个基本特征，这种特征能够使所得到的本发明低聚糖混合物具有前面描述的物理化学特征和活性。

[0031] 事实上，为了得到本发明的特定低聚糖混合物，需要在解聚步骤时，通过非常精确控制在这种混合物中的水含量来控制这种碱的选择性。

[0032] 事实上，本发明方法的特征在于在解聚作用时控制这种碱的高选择性。本发明能够使这种肝素解聚，同时最大限度地保持这些对 ATIII 亲合性的序列，例如本发明中描述的六糖 ΔIIa-IIs-Is。该方法的这个关键步骤确保能够得到本发明的多糖。

[0033] 所述方法的这个特征使得这种平均分子量的低聚糖混合物有出乎意料的抗 Xa 活性（平均分子量 2000-3000 道尔顿时，活性为 150IU/mg ＜抗 Xa ＜ 200IU/mg）。这种选择性是由于膦腈碱具有非常特别的物理化学特征所致，pKa 大于 20 并且具有非常高的空间位阻和弱的亲核性。

[0034] 这种反应介质是无水的时，这种效果充分表现出来了。相反地，反应介质中的水含量增加时，观察到解聚作用的选择性急剧降低。保持对 ATIII 亲合性的序列降低了，其结果是抗 Xa 活性大大降低。在少量水的存在下，膦腈碱变成质子化了，而这些反应物质变成季铵氢氧化物。在这种情况下，失去了非常高的空间位阻和弱的亲核性，于是严重影响了所得产品的质量。采用控制水含量进行解聚作用试验时，可以明显观察到这种效果。

[0035] 下表汇集了水含量对解聚作用选择性的影响（在这些试验中只是改变这个参数：根据本技术领域的技术人员已知的标准，试剂的化学计算量、稀释度与温度保持不变。使用的碱是膦腈碱 :2- 叔 - 丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯 (phosphorine))。

[0036]

水含量%	0.05%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.57%	1.8%	2.5%
抗 Xa IU/mg	192	177	161	132	122	120	105	99
抗 IIa IU/mg	1.3	1.5	1.4	1.4	1.3	1.4	3.1	13.4
抗 Xa/ 抗 IIa	148	118	115	94	94	85.7	34	7.4

[0037] 为了获得最佳选择性和最大保持对 ATIII 亲合性序列，以肝素苄酯，苄乙铵 (benzethonium) 盐计，使用 1 摩尔当量膦腈碱时，优选的是在水含量小于 0.6%、非常优选在小于 0.3% 条件下实施这个步骤。

[0038] 因此，非常特别地，本发明的目的是根据本技术领域的技术人员已知的方法得到的肝素苄酯季铵盐解聚作用步骤，其特征在于使用特别在含有 0.6% 以下水的二氯甲烷溶液中的膦腈类碱。优选水的百分数应该低于 0.3%，特别优选低于 0.2%。

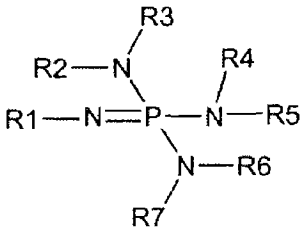
[0039] 最好强碱 / 酯摩尔比是 0.2-5，优选是 0.6-2，特别优选 0.8-1.2。因此，使用等摩尔比为本发明优选的实施方案。

[0040] 可以使用本技术领域的技术人员已知的其它非质子溶剂，例如 THF 或 DMF。

[0041] 这些肝素苄酯季铵盐优选地是苄乙铵、鲸蜡基吡啶鎓或鲸蜡基三甲基铵盐。

[0042] 这些膦腈族碱优选地具有下式：

[0043]



[0044] 式中 R1-R7 相同或不同，代表烷基。

[0045] 在前式中，所述烷基含有 1-6 个直链或支链碳原子。

[0046] 因此，本发明的目的是一种制备本发明低聚糖混合物的方法，该方法包括下述步骤：

[0047] a) 通过苯索氯铵的作用，使肝素钠盐交换 (transalification)，

[0048] b) 通过苄基氯的作用，使苄乙铵肝素盐酯化，

[0049] c) 将得到的苄酯盐交换成季铵盐，

[0050] d) 采用前面定义的方法，使肝素苄酯季铵盐解聚，

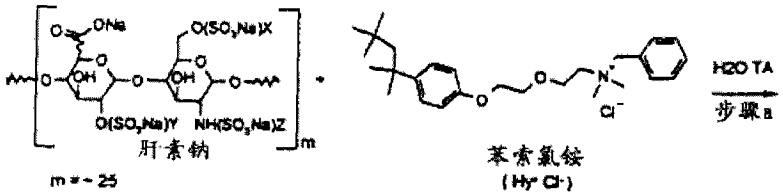
[0051] e) 将季铵盐转化成钠盐，

[0052] f) 通过一种碱，例如氢氧化钠的作用，任选地皂化这种肝素，

[0053] g) 特别地通过一种氧化剂，例如过氧化氢的作用，任选地纯化。

[0054] 下面反应流程图说明本发明：

[0055]



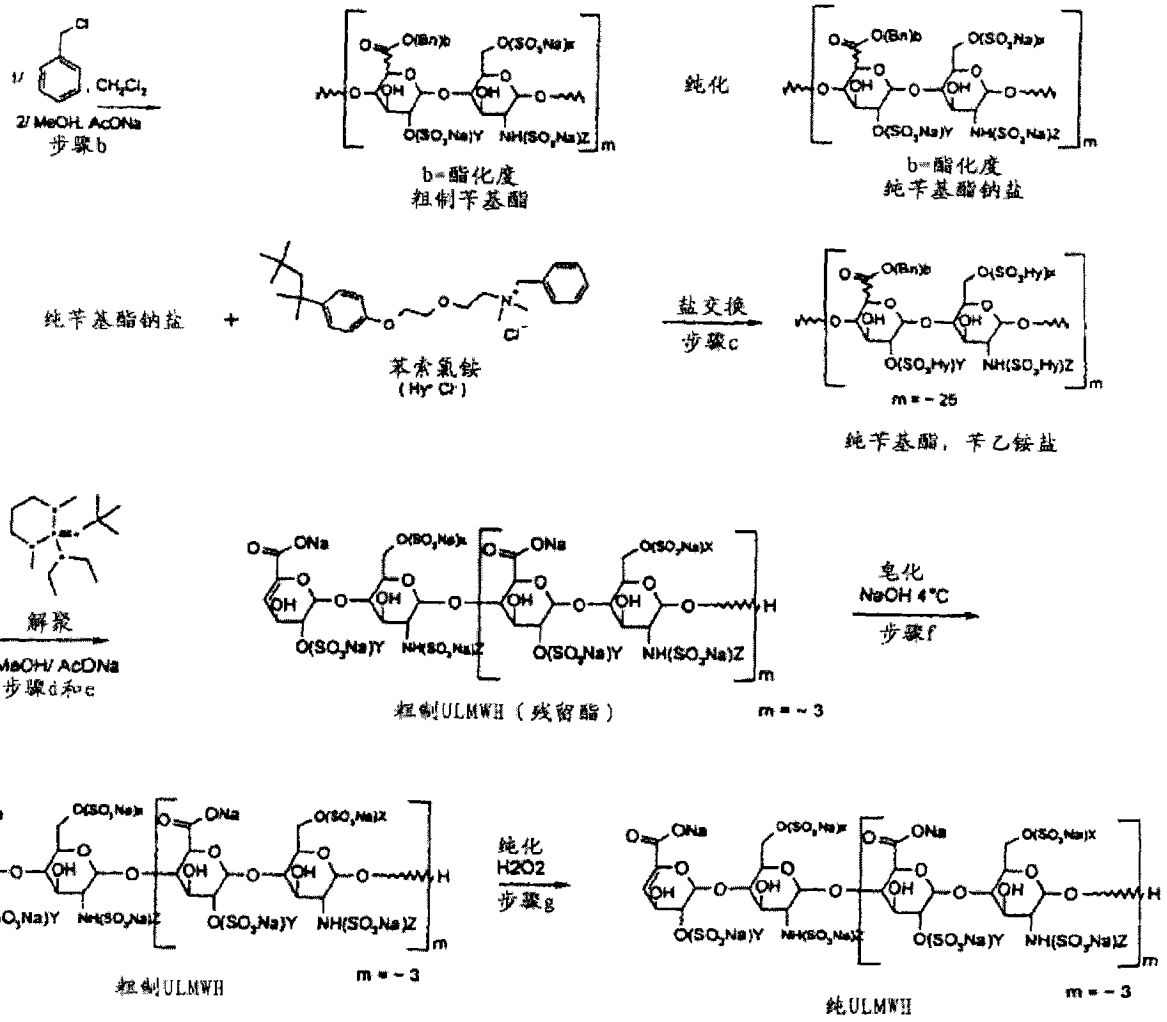
[0056] n = X+Y+Z（二糖的平均硫酸化水平）

[0057] X = 该位点的硫酸化度，其余由基团 H 代表

[0058] Y = 该位点的硫酸化度，其余由基团 H 代表

[0059] Z = 该位点的硫酸化度，其余由基团 $COCH_3$ 代表

[0060]



[0061] 一般地讲，在温度 15-25℃下，使用乙酸钠醇溶液，优选使用 10％（重量 / 体积）乙酸钠甲醇溶液处理这种反应介质，将解聚的肝素苄酯季铵盐转化成钠盐（步骤 e）。加入乙酸盐的重量当量优选地是加入这种解聚反应中的肝素苄酯季铵盐量的三倍。

[0062] 一般而言，在温度 0-20℃，优选在 0-10℃下，在含水介质中，使用碱金属氢氧化物，例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂进行皂化反应（步骤 f）。通常使用 1-5 摩尔当量的碱金属氢氧化物。优选在 1-2 摩尔当量的碱金属氢氧化物存在下进行皂化反应。

[0063] 可以采用任何已知的纯化解聚肝素的方法（例如 EP 0037319B1）任选地纯化这个最后产物（步骤 g）。优选地，在一种含水介质中，在温度 10-50℃下使用过氧化氢进行这种纯化。优选地，在 20-40℃下进行这种操作。

[0064] 按照下述反应流程可以制备这种肝素苄酯季铵盐：

[0065] a) 使用苯索氯铵转化肝素钠，以得到苄乙铵肝素盐（盐交换），

[0066] b) 使用苄基氯，通过用乙酸钠醇溶液处理，使前面得到的苄乙铵盐酯化，以得到肝素苄酯钠盐，

[0067] c) 将肝素苄酯钠盐盐交换成季铵盐，优选地苄乙铵、鲸蜡基吡啶鎓或鲸蜡基三甲基铵盐。

[0068] 在温度 15-25℃下，通过过量苯索氯铵与肝素钠的作用进行步骤 a) 的反应。有利地，盐 / 肝素钠摩尔比是 3-4。

[0069] 使用的原料肝素优选地是猪肝素。按照专利 FR2663639 描述的方法，可以预先对

这种猪肝素进行纯化，以降低其硫酸皮肤素含量。

[0070] 在温度 25-45℃，优选地 30-40℃下，优选地在含氯有机溶剂（例如氯仿或二氯甲烷）中进行步骤 b) 的酯化反应。然后，在一种醇（例如甲醇）中，使用 10 重量％乙酸钠进行沉淀，回收呈苄乙铵盐形式的酯，该盐是钠盐。每个体积的反应介质通常使用 1-1.2 个体积的醇。调节苄基氯的量和反应时间，以达到酯化度 50-100％，优选地 70-90％。优选地，每 1 重量份肝素苄乙铵盐使用 0.5-1.5 重量份苄基氯。同样地，反应时间优选 10-35 小时。

[0071] 在含水介质中，在温度 10-25℃下，使用氯化季铵，优选使用苯索氯铵、氯化鲸蜡吡啶鎓或鲸蜡基三甲基氯化铵进行步骤 c) 的盐交换。有利地，氯化季铵 / 肝素苄酯钠盐摩尔比是 2-3。

[0072] 呈钠盐形式的本发明混合物可以转化成另外的碱金属或碱土金属盐。采用专利FR 73 13 580 描述的方法，可以任选地实现从一种盐到另一种盐的转化。

[0073] 本发明的混合物无毒，因此可以用作药品。

[0074] 本发明的低聚糖混合物可以用作抗血栓形成剂。特别地，它们用于治疗或预防静脉和动脉血栓形成、深静脉栓塞、肺血管梗塞、不稳定型心绞痛、心肌梗塞、心肌缺血、外周动脉梗阻疾病和心房纤颤。它们还用于预防和治疗平滑肌细胞增生、动脉粥样硬化和动脉硬化症，通过调节血管生成和生长因子用于治疗和预防癌，以及用于治疗和预防糖尿病症，例如糖尿病性视网膜病和肾病。

[0075] 本发明还涉及含有一种式 (I) 混合物作为活性组分的药物组合物，任选地还含有一种或多种惰性赋形剂。

[0076] 这些药物组合物例如是可以采用皮下或静脉内注射方式用药的溶液。它们还可以通过肺部（吸入）或通过口服用药。

[0077] 其剂量可随病人的年龄、体重和健康状况而改变。成人肌内或皮下用药剂量通常是每天 20-100mg。

[0078] 本发明还涉及

[0079] 1. 硫酸化低聚糖混合物，它们具有组成肝素的多糖的一般结构，还具有下述特征：

[0080] - 它们的平均分子量是 1500-3000 道尔顿，抗 Xa 活性是 120-200IU/mg，抗 IIa 活性小于 10IU/mg，抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性的比大于 30，

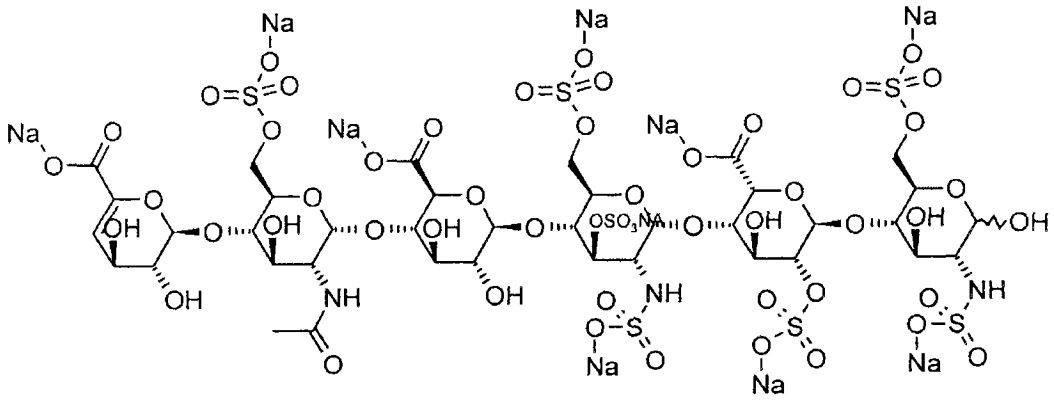
[0081] 这些混合物的组分低聚糖：

[0082] - 含有 2-26 个糖单元，

[0083] - 在其中一个末端有 4,5- 不饱和糖醛酸 2-O- 硫酸酯单元，

[0084] - 含有下式的六糖 ΔIIa-IIs-Is：

[0085]



ΔIIa IIs Is

[0086] 并且这些低聚糖混合物呈碱金属或碱土金属盐形式。

[0087] 2. 根据项所述 1 的低聚糖混合物，其特征在于碱金属或碱土金属盐选自钠、钾、钙和镁盐。

[0088] 3. 根据项 1 或 2 所述的低聚糖混合物，其特征在于它含有六糖馏分，这种馏分占低聚糖混合物的 15-25％。

[0089] 4. 根据项 3 所述的低聚糖混合物，其特征在于在低聚糖混合物的六糖馏分中，含有 8-15％的六糖 ΔIIa-IIs-Is。

[0090] 5. 根据项 1-4 中任一项所述的低聚糖混合物，其特征在于它的抗 Xa 活性是 150-200IU/mg。

[0091] 6. 根据项 1-5 中任一项所述的低聚糖混合物，其特征在于它的抗 IIa 活性小于 5IU/mg，特别是 0.5-3.5IU/mg。

[0092] 7. 根据项 1-6 中任一项所述的低聚糖混合物，其特征在于它的抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比大于 50，特别是大于 100。

[0093] 8. 根据项 1-7 中任一项所述的低聚糖混合物，其特征在于它的平均分子量是 2000-3000 道尔顿，特别是 2400-2650 道尔顿。

[0094] 9. 根据项 1-8 中任一项所述的低聚糖混合物，其特征在于它的抗 Xa 活性是 150-200IU/mg，抗 IIa 活性是 0.5-3.5IU/mg，而平均分子量是 2400-2650 道尔顿。

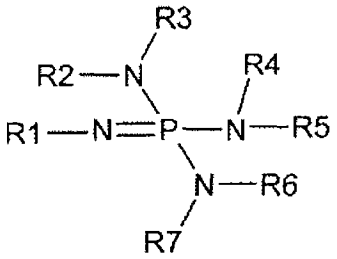
[0095] 10. 一种制备根据项 1-9 中任一项所述低聚糖混合物的方法，在制备过程中，在一种有机介质中，在一种 pKa 大于 20 的强有机碱存在下，对肝素苄酯季铵盐进行解聚，其特征在于使用的有机碱为膦腈族碱，特别是含有水百分数小于 0.6％的膦腈族碱的二氯甲烷溶液。

[0096] 11. 根据项 10 所述的制备项 1 所述低聚糖混合物的方法，其特征在于水含量小于 0.3％，优选小于 0.2％。

[0097] 12. 根据项 10 或 11 所述的制备方法，其特征在于肝素苄酯季铵盐是苄乙铵、鲸蜡基吡啶鎓或鲸蜡基三甲基铵盐。

[0098] 13. 根据项 10 或 11 所述的制备方法，其特征在于膦腈族碱是下式的碱：

[0099]



[0100] 式中 R_1-R_7 是相同或不同的，它们代表含有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基。

[0101] 14. 根据项 10 或 11 所述的制备方法，其特征在于强碱 / 酯的摩尔比是 0.2-5，优选 0.6-2。

[0102] 15. 使用肝素制备项 1-9 中任一项项所述低聚糖的方法，其中进行下述操作 ：

[0103] a) 通过苯索氯铵的作用，使肝素钠盐交换，

[0104] b) 通过苄基氯的作用，使苄乙铵肝素盐酯化，

[0105] c) 将得到的苄酯盐交换成季铵盐，

[0106] d) 采用项 10 或 11 的方法，使肝素苄酯季铵盐解聚，

[0107] e) 将季铵盐转化成钠盐，

[0108] f) 通过一种碱，例如氢氧化钠的作用，任选地皂化所述肝素，

[0109] g) 特别地通过一种氧化剂，例如过氧化氢的作用，任选地纯化。

[0110] 16. 根据项 15 所述的方法，其特征在于在温度约 15-25℃与盐 / 肝素钠摩尔比 3-4 的条件下，通过过量苯索氯铵与肝素钠的作用进行步骤 a) 的反应。

[0111] 17. 根据项 15 所述的方法，其特征在于在含氯有机溶剂中，在温度 25-45℃、优选 30-40℃下进行步骤 b) 的酯化反应，所述的含氯有机溶剂例如是氯仿或二氯甲烷，然后使用 10 重量％乙酸钠醇溶液沉淀回收呈钠盐形式的酯，所述的醇例如是甲醇，所述醇的浓度是每个体积的反应介质为 1-1.2 个体积的醇。

[0112] 18. 根据项 15 或 17 所述的方法，其特征在于肝素苄酯季铵盐的酯化度是 50-100％，优选 70-90％。

[0113] 19. 根据项 15、17 或 18 所述的方法，其特征在于每 1 重量份肝素苄乙铵盐使用 0.5-1.5 重量份苄基氯，反应时间应是 10-35 小时。

[0114] 20. 根据项 15 所述的方法，其特征在于在一种含水介质中，在温度 10-25℃下，使用氯化季铵，优选地使用苯索氯铵、氯化鲸蜡吡啶鎓或鲸蜡基三甲基氯化铵进行步骤 c) 的盐交换。

[0115] 21. 根据项 20 所述的方法，其特征在于氯化季铵 / 肝素苄酯钠盐的摩尔比是 2-3。

[0116] 22. 根据项 15 所述的方法，其特征在于在温度 15-25℃下，使用乙酸钠醇溶液，优选地使用 10％乙酸钠甲醇溶液（重量 / 体积）处理反应介质，使解聚的肝素苄酯季铵盐转化成钠盐（步骤 e)。

[0117] 23. 根据项 15 所述的方法，其特征在于在一种含水介质中，在温度 0-20℃、优选 0-10℃下，使用碱金属氢氧化物进行该皂化作用（步骤 f)，所述的碱金属氢氧化物例如是氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化锂。

[0118] 24. 根据项 23 所述的方法，其特征在于使用 1-5 摩尔当量碱金属氢氧化物，优选 1-2 摩尔当量氢氧化钠。

[0119] 25. 根据项 15 所述的方法，其特征在于在一种含水介质中，在温度 10-50℃、优选

20-40℃下，使用过氧化氢进行所述纯化（步骤 g）。

[0120] 26. 根据项 1-9 中任一项所述的低聚糖作为药物。

[0121] 27. 根据项 1-9 中任一项所述的低聚糖作为具有抗血栓形成活性的药物。

[0122] 28. 根据项 26 或 27 所述的药物，它们用于治疗或预防静脉和动脉血栓形成、深静脉栓塞、肺血管梗塞、不稳定型心绞痛、心肌梗塞、心肌缺血、外周动脉梗阻疾病和心房纤颤、平滑肌细胞增生、动脉粥样硬化病和动脉硬化症，通过调节血管生成和生长因子用于治疗和预防癌，以及用于治疗和预防糖尿病症，例如糖尿病性视网膜病和肾病。

[0123] 29. 一种药物组合物，它含有至少一种如项 26 限定的药物和一种或多种药用惰性赋形剂或载体或添加剂。

[0124] 30. 根据项 29 所述的药物组合物，其特征在于它是采用皮下或静脉内注射方法给药的溶液。

[0125] 31. 根据项 29 所述的药物组合物，其特征在于它是通过肺部吸入方法给药的制剂。

[0126] 32. 根据项 29 所述的药物组合物，其特征在于它是通过口服方法给药的制剂。

[0127] 33. 如项 1-9 中任一项所限定的多糖混合物，它们可以采用项 15 所限定的方法得到。

[0128] 下面实施例说明本发明，而不是限制本发明。

[0129] 实施例 A：制备肝素苄酯苄乙铵盐

[0130] 苄乙铵肝素盐

[0131] 将 25g 苯索氯铵在 125ml 水中的溶液添加到 10g 肝素钠盐在 100ml 水中的溶液里，该产物经过滤后，用水洗涤与干燥。

[0132] 肝素苄酯（钠盐）

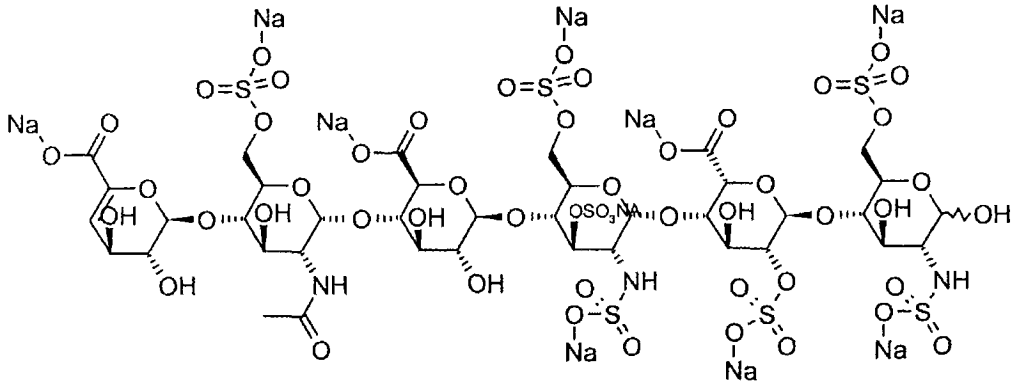
[0133] 将 16ml 苄基氯添加到 20g 肝素苄乙铵盐在 80ml 二氯甲烷中的溶液中。该溶液在温度 30℃下加热 12 小时。然后添加 108ml10％乙酸钠甲醇溶液，混合物经过滤后，用甲醇洗涤与干燥。这样得到 7.6g 肝素苄酯，呈钠盐形式，它的酯化度是 77％。

[0134] 肝素苄酯（苄乙铵盐）

[0135] 将 36g(0.0549mol) 肝素苄酯（钠盐）和 540ml 蒸馏水加到 2 升三角烧瓶 A 中。在温度约 20℃下均化后，得到了淡黄色溶液。在磁搅拌下，在 1 升三角烧瓶 B 中制备了 64.45g(0.1438mol) 苯索氯铵和 450ml 水的溶液。在搅拌下，在约 35 分钟内将三角烧瓶 B 中的溶液倒入在三角烧瓶 A 中的溶液里。观察到已生成大量的白色沉淀物。用 200ml 蒸馏水漂洗三角烧瓶 B，再将洗涤水加到三角烧瓶 A 中。然后停止搅拌，再使这种悬浮液沉淀 12 小时。这个时间一过，就除去上清液的透明部分并弃去。再将 560ml 水添加到沉降的沉淀物（浆体状）中，该混合物搅拌 20 分钟。使这种沉淀物再沉降约 30 分钟。除去上清液并弃去 (560ml)。使用约 560ml 蒸馏水洗涤沉降沉淀物，这个洗涤操作重复进行两次。在最后的洗涤操作中，这种沉淀物呈悬浮液状，再用 3 号烧结玻璃过滤器过滤。这种滤饼然后洗涤 4 次，每次 200ml 蒸馏水。这种白色湿固体经脱水后，在减压下 (2.7kPa) 与温度约 60℃下干燥。干燥 12 小时后，得到 87.5g 肝素苄基酯，为苄乙铵盐。其产率是 94.9％。

[0136] 实施例 B：六糖 ATIII(ΔIIa-IIs-Is) 的描述

[0137]



ΔIIa IIs Is

[0138] 在 D_2O 中的质子谱，500MHz，T ＝ 298K，δ，以 ppm 表示：1.97(3H，s)，3.18(1H，dd，10 和 3Hz)，3.30(1H，t，8Hz)，3.37(1H，dd，10 和 3Hz)，3.60(2H，m)，3.65-3.85(6H，m)，3.87(2H，m)，3.95(1H，d，8Hz)，4.03(1H，d，8Hz)，4.05-4.13(4H，m)，4.16-4.45(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)。

[0139] 4- 脱氧 -α -L- 苏型 - 吡喃己烯糖基糖醛酸 -(1 → 4)-2- 脱氧 -2- 乙酰氨基 -6-O- 磺基 -α -D- 吡喃葡萄糖基 -(1 → 4)-β -D- 吡喃葡萄糖基糖醛酸 -(1 → 4)-2- 脱氧 -2- 磺酰氨基 -3,6- 二 -O- 磺基 -α -D- 吡喃葡萄糖基)-(1 → 4)-2-O- 磺基 -α -L- 吡喃艾杜糖基糖醛酸 -(1 → 4)-2- 脱氧 -2- 磺酰氨基 -6-O- 磺基 -α -D- 吡喃葡糖糖十钠盐。

[0140] 实施例 1-7 和 12 说明了水含量对该聚合反应的选择性和对所得产物的抗 Xa 和抗 IIa 活性的影响。

[0141] 实施例 8-10 说明了碱当量数对所得产物的抗 Xa 和抗 IIa 活性的影响（使用水含量 0.1％）

[0142] 实施例 11 说明了使用除 2- 叔 - 丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯之外的膦腈碱：

[0143] 使用叔 - 丁基亚氨基三（吡咯烷 -1- 基）膦。

[0144] 实施例 1

[0145] 解聚作用并转化成钠盐 (0.1％水）：

[0146] 在三角烧瓶 A 中放入 70ml 二氯甲烷。在搅拌下缓慢加入 10g(0.006mol) 如实施例 A 描述得到的肝素苄酯（酯化度 :75％，苄乙铵盐）。将反应介质的水含量调节到 0.1％。该溶液在氮气下加热到 40℃。在完全溶解后，该溶液冷却到温度约 20℃，然后添加 1.75ml(0.006mol)2- 叔 - 丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。得到的混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备出 30g 无水乙酸钠在 300ml 甲醇中的溶液。完全溶解后，将 5g Hyflo supercel 硅藻土添加到该溶液中。在磁搅拌下，在 1 分 30 秒内将三角烧瓶 A 中的反应混合物倒入温度约 5℃的乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后，使这种悬浮液倾析 1 小时 30 分钟。分离上清液清澈部分，并弃去 (220ml)。然后将 220ml 甲醇添加到这种沉降的沉淀物中，再搅拌 5 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 1 小时 20 分钟。分离并弃去这种上清液 (250ml)。然后将 250ml 甲醇添加到这种沉降的沉淀物中，混合物搅拌 5 分钟。悬浮液中的沉淀物然后用 3 号烧结

玻璃过滤器过滤。得到的滤饼再用 100ml 甲醇洗涤。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 2.51g 在硅藻土 (5g) 中的解聚肝素钠盐。其产率是 64％。

[0147] 皂化作用：

[0148] 将 2.5g(0.0038mol) 前面得到的在硅藻土 (5g) 中的粗制解聚肝素钠盐和 17ml 水放到 50ml 三角烧瓶中。这种悬浮液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤，再用水漂洗两次，每次 5ml。将得到的滤液装入 150ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 5℃下加入 0.4ml(0.004mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 3g 氯化钠。溶解后，将 21ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 44ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液在温度约 5℃下沉降 45 分钟。然后分离并弃去上清液 (90ml)。将 90ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使这种沉淀物再沉降约 20 分钟。分离并弃去上清液 (80ml)。往沉降沉淀物添加 80ml 甲醇，再搅拌 5 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 1.31g 粗制解聚肝素（钠盐）。产率是 66％。

[0149] 纯化：

[0150] 将 1.3g 前面得到的粗制解聚肝素和 13ml 蒸馏水装入 50ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.7±0.1。反应介质使用 0.45μm膜进行过滤，再添加0.07ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时，然后该混合物添加 1N HCl 进行中和，接着加入 2g 氯化钠。该溶液然后用 0.45μm膜过滤，再倒入 14ml 甲醇。该溶液然后冷却到 10℃，搅拌约 15 分钟。然后添加 36ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液倾析约 15 分钟。然后分离并弃去上清液 (50ml)。将 50ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 25 分钟。分离并弃去上清液 (50ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤悬浮液中的沉淀物。得到的白色滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后，在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 1.13g 纯解聚肝素（钠盐）。其产率是 87％。

[0151] 如此得到的解聚肝素特征如下：

[0152] 平均分子量：2600 道尔顿

[0153] 抗 Xa 活性：177IU/mg

[0154] 抗 IIa 活性：1.5IU/mg

[0155] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比：118

[0156] 实施例 2

[0157] 解聚作用并转化成钠盐 (0.2％水）

[0158] 将 70ml 二氯甲烷装入三角烧瓶 A 中。在搅拌下与在氮气压力下，缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 10g(0.006mol) 肝素苄酯（酯化度：75％，苄乙铵盐）。将反应介质的水含量调节到 0.2％。完全溶解后，添加 1.75ml(0.006mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 30g 无水乙酸钠在 300ml 甲醇中的溶液。完全溶解后，将 5g Hyflo supercel 硅藻土添加到该溶液中。在磁搅拌与温度约 5℃下，将三角烧瓶

A 中的反应混合物在 1 分 30 秒内倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后，使这种悬浮液倾析 2 小时。分离并弃去上清液的清澈部分 (220ml)。将 220ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使这种沉淀物再沉降约 2 时。分离并弃去上清液 (230ml)。将 230ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤悬浮液中的沉淀物。得到的滤饼然后用 150ml 甲醇洗涤。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 2.63g 在硅藻土 (5g) 中的粗制解聚肝素。其产率是 67％。

[0159] 皂化作用：

[0160] 将 2.5g(0.0038mol) 前面得到的在硅藻土 (5g) 中的粗制解聚肝素钠盐和 18ml 水放到 50ml 三角烧瓶中。这种悬浮液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤，再用水漂洗两次，每次 5ml。将得到的滤液装入 150ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 5℃下加入 0.4ml(0.004mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 2g 氯化钠。将 14ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 36ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液在温度约 5℃下沉降 45 分钟。然后分离并弃去上清液 (80ml)。将 80ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。往沉降沉淀物添加 80ml 甲醇，再搅拌 5 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 48 小时后，得到 2.3g 粗制解聚肝素（钠盐）。产率是 65％。

[0161] 纯化：

[0162] 将 1.4g 前面得到的粗制解聚肝素和 15ml 蒸馏水装入 50ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.7±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.07ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 40℃下搅拌约 2 小时，然后该混合物冷却到温度 20℃，再添加 1N HCl 进行中和。往该反应介质加入 2g 氯化钠。该溶液然后用 0.45μm 膜过滤，再倒入 14ml 甲醇。该溶液然后冷却到 10℃，搅拌约 15 分钟。这时添加 36ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液倾析约 15 分钟。然后分离并弃去上清液 (40ml)。将 40ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 20 分钟。分离并弃去上清液 (50ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤悬浮液中的沉淀物。得到的白色滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后，在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 1.2g 纯解聚肝素（钠盐）。其产率是 86％。

[0163] 如此得到的解聚肝素特征如下：

[0164] 平均分子量：2650 道尔顿

[0165] 抗 Xa 活性：161IU/mg

[0166] 抗 IIa 活性：1.4IU/mg

[0167] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比：115

[0168] 实施例 3

[0169] 解聚作用并转化成钠盐 (0.3％水）

[0170] 将 70ml 二氯甲烷装入三角烧瓶 A 中。在搅拌下与在氮气压力下，加入如实施例 A 中描述得到的 10g(0.006mol) 肝素苄酯（酯化度：75％，苄乙铵盐）。将反应介质的水含量调节到 0.3％。完全溶解后，添加 1.75ml(0.006mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在

这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 30g 无水乙酸钠在 300ml 甲醇中的溶液。完全溶解后，将 5g Hyflo supercel 硅藻土添加到该溶液中。在磁搅拌与温度约 5℃下，将三角烧瓶 A 中的反应混合物在 1 分 30 秒内倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后，使这种悬浮液倾析 1 小时 10 分钟。分离并弃去上清液的清澈部分 (220ml)。将 220ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤悬浮液中的沉淀物。得到的滤饼然后用 100ml 甲醇洗涤。湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 2.57g 在硅藻土 (5g) 中的粗制解聚肝素钠盐。其产率是 66％。

[0171] 皂化作用：

[0172] 将 2.5g(0.0038mol) 前面得到的在硅藻土 (5g) 中的粗制解聚肝素钠盐和 18ml 水放到 50ml 三角烧瓶中。这种悬浮液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤，再用水漂洗两次，每次 5ml。将得到的滤液装入 150ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 5℃下加入 0.4ml(0.004mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 3g 氯化钠。将 15ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 36ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液倾析 1 小时。然后分离并弃去上清液 (70ml)。将 70ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度 40℃下干燥。干燥 48 小时后，得到 1.42g 粗制解聚肝素（钠盐）。产率是 62％。

[0173] 纯化：

[0174] 将 1.4g 前面得到的粗制解聚肝素和 14ml 蒸馏水装入 50ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.7±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.07ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时后，往该混合物添加 1N HCl 进行中和，然后加入 2g 氯化钠。溶解后，溶液再用 0.45μm 膜过滤，再倒入 14ml 甲醇。该滤液然后冷却到 10℃，搅拌 15 分钟。这时添加 36ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液倾析约 40 分钟。然后分离并弃去上清液 (50ml)。将 50ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物（浆体状）中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 25 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤悬浮液中的沉淀物。得到的白色滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后，在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 1.24g 纯解聚肝素（钠盐）。其产率是 89％。

[0175] 如此得到的解聚肝素特征如下：

[0176] 平均分子量：2400 道尔顿

[0177] 抗 Xa 活性：132IU/mg

[0178] 抗 IIa 活性：1.4IU/mg

[0179] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比：94

[0180] 实施例 4

[0181] 解聚作用并转化成钠盐 (0.4％水)

[0182] 将 70ml 二氯甲烷装入三角烧瓶 A 中。在搅拌下，缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 10g(0.006mol) 肝素苄酯（酯化度：75％，苄乙铵盐）。将反应介质的水含量调节到 0.4％。该溶液在氮气下于 30℃下加热。完全溶解后，再降到温度约 20℃，然后添加 1.75ml(0.006mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂

环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 30g 无水乙酸钠在 300ml 甲醇中的溶液。完全溶解后，将 5g Hyflo supercel 硅藻土添加到该溶液中。在磁搅拌与温度约 5℃下，将三角烧瓶 A 中的反应混合物在 1 分 30 秒内倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后，使这种悬浮液倾析 2 小时。分离并弃去上清液的清澈部分 (80ml)。将 80ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。将沉淀物再沉降约 1 小时。分离上清液并弃去 (80ml)。将 80ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤悬浮液中的沉淀物。得到的滤饼然后用 150ml 甲醇洗涤。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 3.25g 在硅藻土 (5g) 中的粗制解聚肝素钠盐。产率是 83％。

[0183] 皂化作用：

[0184] 将 3.1g(0.0018mol) 前面得到的在硅藻土 (10g) 中的粗制解聚肝素钠盐和 21ml 水放到 50ml 三角烧瓶中。这种悬浮液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤，再用水漂洗两次，每次 6ml。将得到的滤液装入 150ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 5℃下加入 0.7ml(0.007mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 4g 氯化钠。将 28ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 72ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液倾析 1 小时。然后分离并弃去上清液 (90ml)。将 90ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 20 分钟。然后分离并弃去上清液 (90ml)。将 90ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 48 小时后，得到 1.9g 粗制解聚肝素（钠盐）。产率是 67％。

[0185] 纯化：

[0186] 将 1.9g 前面得到的粗制解聚肝素和 19ml 蒸馏水装入 50ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.7±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.1ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时后，往该混合物添加 1N HCl 进行中和，然后加入 2g 氯化钠。这种溶液用 0.45μm 膜过滤，再倒入 14ml 甲醇，搅拌 15 分钟。这时添加 36ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液倾析 15 分钟。然后分离并弃去上清液 (40ml)。将 40ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 20 分钟。分离并弃去上清液 (50ml)。将 500ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 20 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤沉淀物。得到的白色滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后，在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 72 小时后，得到 1.56g 纯解聚肝素（钠盐）。其产率是 82％。

[0187] 如此得到的解聚肝素特征如下：

[0188] 平均分子量：2350 道尔顿

[0189] 抗 Xa 活性：122IU/mg

[0190] 抗 IIa 活性：1.3IU/mg

[0191] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比：94

[0192] 实施例 5

[0193] 解聚作用并转化成钠盐 (0.57％水)

[0194] 将 140ml 二氯甲烷装入三角烧瓶 A 中。在搅拌下，缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 20g(0.019mol) 肝素苄酯 (酯化度 :75％，苄乙铵盐)。将反应介质的水含量调节到 0.57％。完全溶解后，添加 3.5ml(0.012mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 60g 无水乙酸钠在 600ml 甲醇中的溶液。完全溶解后，将 10g Hyflo supercel 硅藻土添加到该溶液中。在磁搅拌与温度约 4℃下，将三角烧瓶 A 中的反应混合物在 1 分 30 秒内倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后，使这种悬浮液倾析 30 分钟。分离并弃去上清液的清澈部分 (400ml)。将 400ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使这种沉淀物再沉降约 1 小时。分离并弃去上清液 (420ml)。将 420ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤悬浮液。得到的滤饼然后用 200ml 甲醇洗涤。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 6.66g 在硅藻土 (10g) 中的粗制解聚肝素钠盐。产率是 85％。

[0195] 皂化作用 :

[0196] 将 6.66g(0.0101mol) 前面得到的在硅藻土 (10g) 中的粗制解聚肝素钠盐和 47ml 水放到 50ml 三角烧瓶中。这种悬浮液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤，再用水漂洗两次，每次 15ml。将得到的滤液装入 150ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 5℃下加入 1.1ml(0.011mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 9.5g 氯化钠。将 66ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 171ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液在温度约 5℃下倾析 3/4 小时。然后分离并弃去上清液 (160ml)。将 160ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 20 分钟。然后分离并弃去上清液 (180ml)。将 180ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。用 3 号烧结玻璃过滤器过滤悬浮液。得到的滤饼再用甲醇洗涤两次，每次 50ml。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 4.53g 粗制解聚肝素 (钠盐)。产率是 74％。

[0197] 纯化 :

[0198] 将 4.53g 前面得到的粗制解聚肝素和 45ml 蒸馏水装入 100ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.7±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.25ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时后，往该混合物添加 1N HCl 进行中和，然后加入 5.5g 氯化钠。这种溶液用 0.45μm 膜过滤，再在温度约 10℃下倒入 38ml 甲醇。该溶液然后升到 20℃，搅拌 15 分钟。这时添加 100ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液倾析 20 分钟。然后分离并弃去上清液 (90ml)。将 90ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 25 分钟。分离并弃去上清液 (100ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的白色滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后，在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 3.7g 纯解聚肝素 (钠盐)。其产率是 82％。

[0199] 如此得到的解聚肝素特征如下 :

[0200] 平均分子量 :2200 道尔顿

[0201] 抗 Xa 活性 :120IU/mg

[0202] 抗 IIa 活性 :1.4IU/mg

[0203] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比 :86

[0204] 实施例 6

[0205] 解聚作用并转化成钠盐 (1.8％水)

[0206] 将 140ml 二氯甲烷装入三角烧瓶 A 中。在搅拌下,缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 20g(0.019mol) 肝素苄酯 (酯化度 :75％,苄乙铵盐)。将反应介质的水含量调节到 1.8％。完全溶解后,添加 3.5ml(0.012mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间,在三角烧瓶 B 中制备 60g 无水乙酸钠在 600ml 甲醇中的溶液。完全溶解后,将 10g Hyflo supercel 硅藻土添加到该溶液中。在磁搅拌与温度约 4℃下,将三角烧瓶 A 中的反应混合物在 1 分 30 秒内倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后,使这种悬浮液倾析 30 分钟。分离并弃去上清液的清澈部分 (400ml)。将 400ml 甲醇添加到沉降沉淀物中,搅拌 5 分钟。使这种沉淀物再沉降约 1 小时。分离并弃去上清液 (420ml)。将 420ml 甲醇添加到沉降沉淀物中,搅拌 5 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼然后用 200ml 甲醇洗涤。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 50℃下干燥。干燥 18 小时后,得到 7.54g 在硅藻土 (10g) 中的粗制解聚肝素钠盐。产率是 96％。

[0207] 皂化作用 :

[0208] 将 7.54g(0.0101mol) 前面得到的在硅藻土 (10g) 中的粗制解聚肝素钠盐和 53ml 水放到 50ml 三角烧瓶中。这种悬浮液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤,再用水漂洗两次,每次 15ml。将得到的滤液装入 150ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 4℃下加入 1.25ml(0.012mol)30％氢氧化钠溶液。加完后,该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和,再加入 10.5g 氯化钠。将 70ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后,加入 190ml 甲醇,接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌,使这种悬浮液在温度约 4℃下沉降 3/4 小时。然后分离并弃去上清液 (180ml)。将 180ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中,搅拌 5 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 20 分钟。然后分离并弃去上清液 (180ml)。将 180ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中,搅拌 5 分钟。用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用甲醇洗涤两次,每次 50ml。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度 50℃下干燥。干燥 18 小时后,得到 5.53g 粗制解聚肝素 (钠盐)。产率是 80％。

[0209] 纯化 :

[0210] 将 5.53g 前面得到的粗制解聚肝素和 55ml 蒸馏水装入 100ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.7±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤,再添加 0.31ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时后,往该混合物添加 1N HCl 进行中和,然后加入 7g 氯化钠。这种溶液用 0.45μm 膜过滤,再在温度约 10℃下倒入 49ml 甲醇。该溶液然后升到 20℃,搅拌 15 分钟。这时添加 126ml 甲醇,接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌,使这种悬浮液沉降 20 分钟。然后分离并弃去上清液 (105ml)。将 105ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中,搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 25 分钟。分离并弃去上清液 (110ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的白色滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后,在减压 (6kPa) 与温度约 55℃下干燥。干燥 18 小时后,得到 4.53g 纯解聚肝素 (钠盐)。其产率是 82％。

[0211] 如此得到的解聚肝素特征如下：

[0212] 平均分子量：2600 道尔顿

[0213] 抗 Xa 活性：105IU/mg

[0214] 抗 IIa 活性：3.1IU/mg

[0215] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比：34

[0216] 实施例 7

[0217] 解聚作用并转化成钠盐 (2.5％水)

[0218] 将 140ml 二氯甲烷装入三角烧瓶 A 中。在搅拌下，缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 20g(0.019mol) 肝素苄酯 (酯化度：75％，苄乙铵盐)。将反应介质的水含量调节到 2.5％。完全溶解后，添加 3.5ml(0.012mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 60g 无水乙酸钠在 600ml 甲醇中的溶液。完全溶解后，将 10g Hyflo supercel 硅藻土添加到该溶液中。在磁搅拌与温度约 4℃下，将三角烧瓶 A 中的反应混合物在 1 分 30 秒内倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后，使这种悬浮液倾析 1 小时。分离并弃去上清液的清澈部分 (400ml)。将 400ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使这种沉淀物再沉降约 30 分钟。分离并弃去上清液 (400ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼然后用 200ml 甲醇洗涤。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 50℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 7.78g 在硅藻土 (10g) 中的粗制解聚肝素钠盐。产率是 99.6％。

[0219] 皂化作用：

[0220] 将 7.78g(0.0119mol) 前面得到的在硅藻土 (10g) 中的粗制解聚肝素钠盐和 79ml 水放到 50ml 三角烧瓶中。这种悬浮液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤，再用水漂洗两次，每次 15ml。将得到的滤液装入 150ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 4℃下加入 1.3ml(0.012mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 10g 氯化钠。将 60ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 190ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液在温度约 4℃下沉降 3/4 小时。然后分离并弃去上清液 (180ml)。将 180ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 20 分钟。然后分离并弃去上清液 (180ml)。将 180ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用甲醇洗涤两次，每次 50ml。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度 50℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 5.87g 粗制解聚肝素 (钠盐)。产率是 82％。

[0221] 纯化：

[0222] 将 5.87g 前面得到的粗制解聚肝素和 59ml 蒸馏水装入 100ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.7±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.34ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时后，往该混合物添加 1N HCl 进行中和，然后加入 7g 氯化钠。这种溶液用 0.45μm 膜过滤，再在温度约 10℃下倒入 49ml 甲醇。该溶液然后升到 20℃，搅拌 15 分钟。这时添加 126ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液沉降 20 分钟。然后分离并弃去上清液 (105ml)。将 105ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 25

分钟。分离并弃去上清液 (110ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的白色滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后，在减压 (6kPa) 与温度约 55℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 5.21g 纯解聚肝素（钠盐）。其产率是 89％。

[0223] 如此得到的解聚肝素特征如下：

[0224] 平均分子量 :3550 道尔顿

[0225] 抗 Xa 活性 :99IU/mg

[0226] 抗 IIa 活性 :13.4IU/mg

[0227] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比 :7.4

[0228] 实施例 8

[0229] 解聚作用并转化成钠盐 (0.5 当量碱）

[0230] 将 140ml 二氯甲烷装入三角烧瓶 A 中。在搅拌下，缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 20g(0.019mol) 肝素苄酯（酯化度 :75％，苄乙铵盐）。在温度约 30℃下完全溶解，再降到温度约 20℃后，添加 1.75ml(0.006mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 60g 无水乙酸钠在 600ml 甲醇中的溶液。在磁搅拌与温度约 4℃下，将三角烧瓶 A 中的反应混合物倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 1 小时后，使这种悬浮液倾析 2 小时。分离并弃去上清液的清澈部分 (420ml)。将 420ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。使这种沉淀物再沉降约 18 小时。分离并弃去上清液 (400ml)。将 400ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。分离并弃去上清液的清澈部分 (400ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼然后用甲醇洗涤两次，每次 100ml。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 60℃下干燥。干燥后，得到 5.7g 粗制解聚肝素钠盐。产率是 73％。

[0231] 皂化作用：

[0232] 将 5.7g(0.0086mol) 前面得到的粗制解聚肝素钠盐和 53ml 水放到 100ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 4℃下加入 0.93ml(0.009mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 6g 氯化钠。将 42ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 108ml 甲醇，接着搅拌 30 分钟。这时停止搅拌，使这种悬浮液在温度约 4℃下沉降 30 分钟。然后分离并弃去上清液 (180ml)。将 180ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 30 分钟。然后分离并弃去上清液 (170ml)。将 170ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用甲醇洗涤两次，每次 30ml。这种湿固体经脱水后在减压与温度 60℃下干燥。干燥后，得到 3.5g 粗制解聚肝素（钠盐）。产率是 67.4％。

[0233] 纯化：

[0234] 将 3.5g 前面得到的粗制解聚肝素和 35ml 蒸馏水装入 100ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.6±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.18ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时后，往该混合物添加 1N HCl 进行中和，然后加入 3.6g 氯化钠。这种溶液用 0.45μm 膜过滤，再在温度约 10℃下倒入 27ml 甲醇。该溶液然后升到 20℃，搅拌 15 分钟。这时添加 65ml 甲醇，接着搅拌 30 分钟。这时停止搅拌，使这种悬浮液沉降 30 分钟。然后分离并弃去上清

液 (80ml)。将 80ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。使沉淀物再沉降约 30 分钟。分离并弃去上清液 (70ml)。将 70ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的白色滤饼再用甲醇洗涤两次，每次 30ml。这种湿固体经脱水后，在减压与温度约 60℃下干燥。干燥后，得到 2.8g 纯解聚肝素 (钠盐)。其产率是 80％。

[0235] 如此得到的解聚肝素特征如下 ：

[0236] 平均分子量 :2900 道尔顿

[0237] 抗 Xa 活性 :146.1IU/mg

[0238] 抗 IIa 活性 :5.1IU/mg

[0239] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比 :28.6

[0240] 实施例 9

[0241] 解聚作用并转化成钠盐 (0.6 当量碱)

[0242] 将 280ml 二氯甲烷装入三颈瓶 A 中。在搅拌下，缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 40g(0.024mol) 肝素苄酯 (酯化度 :75％，苄乙铵盐)。在温度约 30℃下完全溶解，再降到温度约 20℃后，添加 4.2ml(0.014mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 60g 无水乙酸钠在 600ml 甲醇中的溶液。在磁搅拌与温度约 4℃下，将三颈瓶 A 中的一半反应混合物倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 1 小时后，使这种悬浮液倾析。分离并弃去上清液的清澈部分 (310ml)。将 310ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 1 小时。使这种沉淀物再沉降约 18 小时。分离并弃去上清液 (400ml)。将 400ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 1 小时。分离并弃去上清液 (300ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼然后用甲醇洗涤两次，每次 100ml。淡黄色湿固体经脱水后在减压与温度约 60℃下干燥。干燥后，得到 6g 粗制解聚肝素钠盐。产率是 77％。

[0243] 皂化作用 ：

[0244] 将 6g(0.0091mol) 前面得到的粗制解聚肝素钠盐和 56ml 水放到 250ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 4℃下加入 1ml(0.010mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 6.4g 氯化钠。将 45ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 115ml 甲醇，接着搅拌 30 分钟。这时停止搅拌，使这种悬浮液在温度约 4℃下沉降 30 分钟。然后分离并弃去上清液 (170ml)。将 170ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 30 分钟。然后分离并弃去上清液 (140ml)。将 140ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用甲醇洗涤两次，每次 30ml。这种湿固体经脱水后在减压与温度 60℃下干燥。干燥后，得到 3.6g 粗制解聚肝素 (钠盐)。产率是 65.3％。

[0245] 纯化 ：

[0246] 将 3.5g 前面得到的粗制解聚肝素和 35ml 蒸馏水装入 100ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.6±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.18ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时后，往该混合物添加 1N HCl 进行中和，然后加入 3.5g 氯化钠。这种溶液用 0.45μm 膜过滤，再在温度约 10℃下倒入 25ml 甲醇。该溶液然后升到 20℃，搅拌 15 分钟。这时添加 63ml

甲醇，接着搅拌 30 分钟。这时停止搅拌，使这种悬浮液沉降 30 分钟。然后分离并弃去上清液 (70ml)。将 70ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。使沉淀物再沉降几分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的白色滤饼再用甲醇洗涤两次，每次 30ml。这种湿固体经脱水后，在减压与温度约 60℃下干燥。干燥后，得到 2.5g 纯解聚肝素 (钠盐)。其产率是 71.4％。

[0247] 如此得到的解聚肝素特征如下 :

[0248] 平均分子量 :2600 道尔顿

[0249] 抗 Xa 活性 :150.5IU/mg

[0250] 抗 IIa 活性 :3.2IU/mg

[0251] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比 :47

[0252] 实施例 10

[0253] 解聚作用并转化成钠盐 (0.8 当量碱)

[0254] 将 70ml 二氯甲烷装入三颈瓶 A 中。在搅拌下，缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 10g(0.006mol) 肝素苄酯 (酯化度 :75％，苄乙铵盐)。在温度约 30℃下完全溶解，再降到温度约 20℃后，添加 1.38ml(0.004mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 30g 无水乙酸钠在 300ml 甲醇中的溶液。在磁搅拌与温度约 4℃下，将三颈瓶 A 中的反应混合物在 1 分钟 15 秒内倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后，使这种悬浮液倾析 1 小时。分离并弃去上清液的清澈部分 (190ml)。将 190ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使这种沉淀物再沉降约 30 分钟。分离并弃去上清液 (190ml)。将 190ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。分离并弃去上清液 (190ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼然后用 150ml 甲醇洗涤。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 3.05g 粗制解聚肝素钠盐。产率是 80％。

[0255] 皂化作用 :

[0256] 将 3.05g(0.0048mol) 前面得到的粗制解聚肝素钠盐和 21ml 水放到 100ml 三角烧瓶中。该溶液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤，用水漂洗两次，每次 6ml。得到的滤液装入 150ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 4℃下加入 0.6ml(0.006mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 4g 氯化钠。将 28ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 72ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液在温度约 4℃下沉降 30 分钟。然后分离并弃去上清液 (80ml)。将 80ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 30 分钟。然后分离并弃去上清液 (80ml)。将 80ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 30 分钟。用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度 40℃下干燥。干燥后，得到 1.6g 粗制解聚肝素 (钠盐)。产率是 57％。

[0257] 纯化 :

[0258] 将 1.6g 前面得到的粗制解聚肝素和 16ml 蒸馏水装入 50ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.6±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.08ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时

后，往该混合物添加 1N HCl 进行中和，然后加入 2g 氯化钠。这种溶液用 0.45μm 膜过滤，再在温度约 10℃下倒入 14ml 甲醇。该溶液然后升到 20℃，搅拌 15 分钟。这时添加 36ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液沉降 30 分钟。然后分离并弃去上清液 (50ml)。将 50ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 30 分钟。分离并弃去上清液 (50ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。这种湿固体经脱水后，在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥后，得到 1.25g 纯解聚肝素 (钠盐)。其产率是 78％。

[0259] 如此得到的解聚肝素特征如下：

[0260] 平均分子量 :2400 道尔顿

[0261] 抗 Xa 活性 :154.3IU/mg

[0262] 抗 IIa 活性 :1.6IU/mg

[0263] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比 :96.4

[0264] 实施例 11

[0265] 解聚作用并转化成钠盐

[0266] 将 140ml 二氯甲烷装入三颈瓶 A 中。在搅拌下，缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 20g(0.019mol) 肝素苄酯 (酯化度 :75％，苄乙铵盐)。在温度约 40℃下完全溶解，再降到温度约 20℃后，添加 3.5ml(0.011mol) 叔丁基亚氨基 - 三 (吡咯烷 -1- 基) 膦。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 60g 无水乙酸钠在 600ml 甲醇中的溶液。在完全溶解后，将 10gHyflo supercel 硅藻土添加到该溶液中。在磁搅拌与温度约 4℃下，将三颈瓶 A 中的反应混合物在 1 分钟 30 秒内倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后，使这种悬浮液倾析 30 分钟。分离并弃去上清液的清澈部分 (400ml)。将 400ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使这种沉淀物再沉降约 1 小时 20 分钟。分离并弃去上清液 (250ml)。将 250ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼然后用 200ml 甲醇洗涤。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥后，得到 5.39g 粗制解聚肝素钠盐。产率是 69％。

[0267] 皂化作用：

[0268] 将 5g(0.0076mol) 前面得到的粗制解聚肝素 (苄酯，钠盐) 和 35ml 水放到 50ml 三角烧瓶中。该溶液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤，用水漂洗两次，每次 10ml。得到的滤液装入 250ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 4℃下加入 1ml(0.01mol)30％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 2 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 6g 氯化钠。将 42ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 104ml 甲醇，接着搅拌 15 分钟。这时停止搅拌，使这种悬浮液在温度约 4℃下沉降 1 小时。然后分离并弃去上清液 (140ml)。将 140ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 45 分钟。然后分离并弃去上清液 (160ml)。将 160ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的滤饼再用 100ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥后，得到 2.7g 粗制解聚肝素 (钠盐)。产率是 59％。

[0269] 纯化：

[0270] 将 2.6g 前面得到的粗制解聚肝素和 25ml 蒸馏水装入 50ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.7±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.15ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时后，往该混合物添加 1N HCl 进行中和，然后加入 3g 氯化钠。这种溶液用 0.45μm 膜过滤，再在温度约 10℃下倒入 21ml 甲醇。该溶液然后升到 20℃，搅拌 15 分钟。这时添加 54ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液沉降 20 分钟。然后分离并弃去上清液 (50ml)。将 50ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 20 分钟。分离并弃去上清液 (50ml)。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的白色滤饼再用 50ml 甲醇洗涤。这种湿固体经脱水后，在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 2.35g 纯解聚肝素 (钠盐)。其产率是 90％。

[0271] 如此得到的解聚肝素特征如下 :

[0272] 平均分子量 :2400 道尔顿

[0273] 抗 Xa 活性 :167.5IU/mg

[0274] 抗 IIa 活性 :1.1IU/mg

[0275] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比 :152

[0276] 实施例 12

[0277] 解聚作用并转化成钠盐 (0.05％水)

[0278] 将 140ml 二氯甲烷装入三颈瓶 A 中。在搅拌下，缓慢加入如实施例 A 中描述得到的 20g(0.019mol) 肝素苄酯 (酯化度 :75％，苄乙铵盐)。往该反应介质添加 20g 4A 分子筛，将水含量调节到 0.05％，同时缓慢搅拌 48 小时。在惰性气氛下将其上清液转移到三颈瓶 A 中。在完全溶解后，添加 3.5ml(0.012mol)2- 叔丁基亚氨基 -2- 二乙基氨基 -1,3- 二甲基全氢 -1,2,3- 二氮杂磷杂环己烯。这种混合物在温度约 20℃下搅拌 24 小时。在这个时间，在三角烧瓶 B 中制备 60g 无水乙酸钠在 600ml 甲醇中的溶液。在完全溶解后，将 10g Hyflo supercel 硅藻土添加到该溶液中。在磁搅拌与温度约 4℃下，将三颈瓶 A 中的反应混合物在 2 分钟内倒入上述乙酸钠甲醇溶液中。在搅拌 5 分钟后，使这种悬浮液倾析 1 小时。分离并弃去上清液的清澈部分 (420ml)。将 420ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 15 分钟。使这种沉淀物再沉降约 1 小时。分离并弃去上清液 (450ml)。将 450ml 甲醇添加到沉降沉淀物中，搅拌 15 分钟。然后用 3 号烧结玻璃过滤器过滤悬浮液。得到的滤饼然后用 200ml 甲醇洗涤。淡黄色湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 50℃下干燥。干燥 16 小时后，得到 5.36g 在硅藻土 (10g) 中的粗制解聚肝素钠盐。产率是 68.6％。

[0279] 皂化作用 :

[0280] 将 5.36g(0.00817mol) 前面得到的粗制解聚肝素钠盐和 50ml 水放到 50ml 三角烧瓶中。该悬浮液用 3 号烧结玻璃过滤器过滤，用水漂洗四次，每次 15ml。得到的滤液装入 150ml 三角烧瓶中。在磁搅拌与温度约 4℃下加入 1.01ml(0.0122mol)35％氢氧化钠溶液。加完后，该混合物搅拌 3 小时。这种溶液用 1N HCl 进行中和，再加入 11g 氯化钠。将 77ml 甲醇添加到反应介质中。搅拌 15 分钟后，加入 200ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液在温度约 4℃下沉降 1 小时。然后分离并弃去上清液 (240ml)。将 240ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 10 分钟。再使这种沉淀物再沉降约 30 分钟。然后分离并弃去上清液 (225ml)。将 225ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 10 分钟。用 3 号

烧结玻璃过滤器过滤悬浮液。得到的滤饼再用甲醇洗涤两次，每次 50ml。这种湿固体经脱水后在减压 (6kPa) 与温度约 40℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 2.65g 粗制解聚肝素（钠盐）。产率是 53.7％。

[0281] 纯化：

[0282] 将 2.65g 前面得到的粗制解聚肝素和 26.5ml 蒸馏水装入 100ml 三角烧瓶中。这种混合物在磁搅拌下升温到 40℃。加入 1N 氢氧化钠将其 pH 调节到 9.7±0.1。反应介质使用 0.45μm 膜进行过滤，再添加 0.25ml 30％过氧化氢水溶液。在温度约 20℃下搅拌约 2 小时后，往该混合物添加 1N HCl 进行中和，然后加入 3g 氯化钠。这种溶液用 0.45μm 膜过滤，再在温度约 10℃下倒入 21ml 甲醇。该溶液然后升到 20℃，搅拌 15 分钟。这时添加 54ml 甲醇，接着搅拌 1 小时。这时停止搅拌，使这种悬浮液沉降 45 分钟。然后分离并弃去上清液 (46ml)。将 46ml 甲醇添加到这种沉降沉淀物中，搅拌 5 分钟。使沉淀物再沉降约 30 分钟。分离并弃去上清液 (50ml)。然后用 4 号烧结玻璃过滤器过滤呈悬浮状的沉淀物。得到的白色滤饼再用两份甲醇洗涤，每份 10ml。这种湿固体经脱水后，在减压 (6kPa) 与温度约 50℃下干燥。干燥 18 小时后，得到 2.363g 纯解聚肝素（钠盐）。其产率是 89.1％。

[0283] 如此得到的解聚肝素特征如下：

[0284] 平均分子量：2500 道尔顿

[0285] 抗 Xa 活性：192IU/mg

[0286] 抗 IIa 活性：1.3IU/mg

[0287] 抗 Xa 活性 / 抗 IIa 活性比：148。