



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 827**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04785991 .3**
96 Fecha de presentación : **22.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1651677**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

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

30 Prioridad: **24.07.2003 FR 03 09041**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.03.2011

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

72 Inventor/es: **Laux, Volker;**
Mourier, Pierre y
Viskov, Christian

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 355 827 T3

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

El peso molecular medio se determina por cromatografía líquida de alta presión utilizando dos columnas en serie, por ejemplo, las comercializadas con el nombre de TSK G3000 XL y TSK G2000 XL. La detección se realiza por refractometría. El eluyente utilizado es nitrato de litio y el caudal es 0,6 ml/min. El sistema se calibra con estándares preparados por fraccionamiento de la Enoxaparina por cromatografía en gel de agarosa-poliacrilamida (IBF). Esta preparación se realiza según la técnica descrita por Barrowcliffe et al, Thromb. Res., 12, 27-36 (1977-78) o D.A. Lane et al, Thromb. Res., 12, 257-271 (1977-78). Los resultados se calculan mediante el programa informático GPC6 (Perkin Elmer). La actividad anti-Xa se mide por el método amidolítico sobre un sustrato cromogénico según el principio descrito por Teien et al, Thromb. Res., 10, 399-410 (1977). Las dosificaciones se realizan según el método descrito en la monografía de las heparinas de baja masa molecular de la farmacopea europea en vigor, con la excepción del tampón de reconstitución: la albúmina del tampón Tris-NaCl pH 7,4 se reemplaza por Polietilen Glicol 6000 (PEG 6000).

La medida de la actividad anti-Xa se realiza respecto a una heparina de muy bajo peso molecular (HTBPM) estándar que se titula de 140 a 180 U/mg (sobre seco). La actividad de la HTBPM estándar se mide respecto al patrón internacional estándar de la heparina de bajo peso molecular.

Esta HTBPM estándar se preparó según la enseñanza de las solicitudes de patente WO WO02/08295 y principalmente de WO2004/033503. La actividad de la HTBPM estándar se mide respecto al patrón internacional estándar de la heparina de bajo peso molecular.

La actividad anti-IIa se mide por el método amidolítico sobre un sustrato cromogénico según el método descrito en la monografía de las heparinas de baja masa molecular de la farmacopea europea en vigor. La medida de las actividades alla se realiza respecto a una heparina de muy bajo peso molecular (HTBPM) estándar con actividad medida 2,1 UI/mg. La actividad de HTBPM estándar se mide respecto al patrón internacional estándar de la heparina de bajo peso molecular.

Según un modo preferido, la mezcla de oligosacáridos según la invención contiene de 20 a 100% de una fracción hexasacárida. En particular, esta mezcla contiene de 30 a 60% de fracción hexasacárida.

Por otra parte, las mezclas según la invención contienen de 20 a 70% del hexasacárido Δ IIa-II₂-Is en la fracción hexasacárida de la mezcla de oligosacáridos. En particular, esta fracción Δ IIa-II₂-Is está presente en la fracción hexasacárida a nivel de 25 a 50%.

El porcentaje de la fracción hexasacárida puede determinarse de forma analítica por cromatografía líquida de alta presión en columnas TSK G3000 XL y TSK G2000 XL o bien por separación preparativa de la fracción hexasacárida.

La mezcla en este caso se cromatografía en columnas rellenas de gel de tipo poliacrilamida agarosa. La mezcla se eluye con una disolución de hidrógenocarbonato de sodio. Preferentemente, la disolución de hidrógenocarbonato de sodio es una disolución de 0,1 moles/ l a 1 mol/l. Aún más preferentemente, la separación se realiza a una concentración de 1 mol/l. La detección se realiza por espectrometría UV (254nm). Después del fraccionamiento, la fracción hexasacárida en disolución en hidrógenocarbonato de sodio se neutraliza con ácido acético glacial. La disolución se concentra bajo presión reducida de forma que se obtiene una concentración de acetato de sodio superior a 30% en peso. La fracción de hexasacárido se precipita por adición de 3 a 5 volúmenes de metanol. La fracción de hexasacáridos se recupera por filtración sobre vidrio sinterizado n°3. La mezcla de hexasacáridos obtenida puede analizarse por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para determinar el contenido en hexasacárido Δ IIa-II₂-Is. El hexasacárido Δ IIa-II₂-Is puede aislarse por cromatografía HPLC preparativa o por cromatografía de afinidad en columna antitrombina III sefarsa según las técnicas utilizadas por el experto en la técnica (M. Hook, I. Bjork, J. Hopwood y U. Lindahl, F.E B.S letters, vol 656(1) (1976)).

Preferentemente, las mezclas según la invención tienen un peso molecular medio comprendido entre 1.900 y 2.200 Daltons y en particular de 1.950 a 2.150 Daltons.

Según un modo preferido, la mezcla de oligosacáridos según la invención se **caracteriza porque** presenta una actividad anti-Xa comprendida entre 190 UI/mg y 410 UI/mg y una actividad anti-IIa nula o prácticamente nula. Muy particularmente, la actividad anti-Xa está comprendida entre 200 y 300 UI.

La invención tiene por lo tanto muy particularmente por objeto las mezclas que presentan las características siguientes:

- un peso molecular medio comprendido entre 1.950 y 2.150 Daltons.
- una actividad anti-Xa comprendida entre 190 UI/mg y 410 UI/mg y una actividad anti-IIa inferior a 0,2 UI/mg.
- contienen de 30 a 60% de fracción hexasacárida que contiene de 25 a 55% de fracción Δ IIa-II₂-Is.

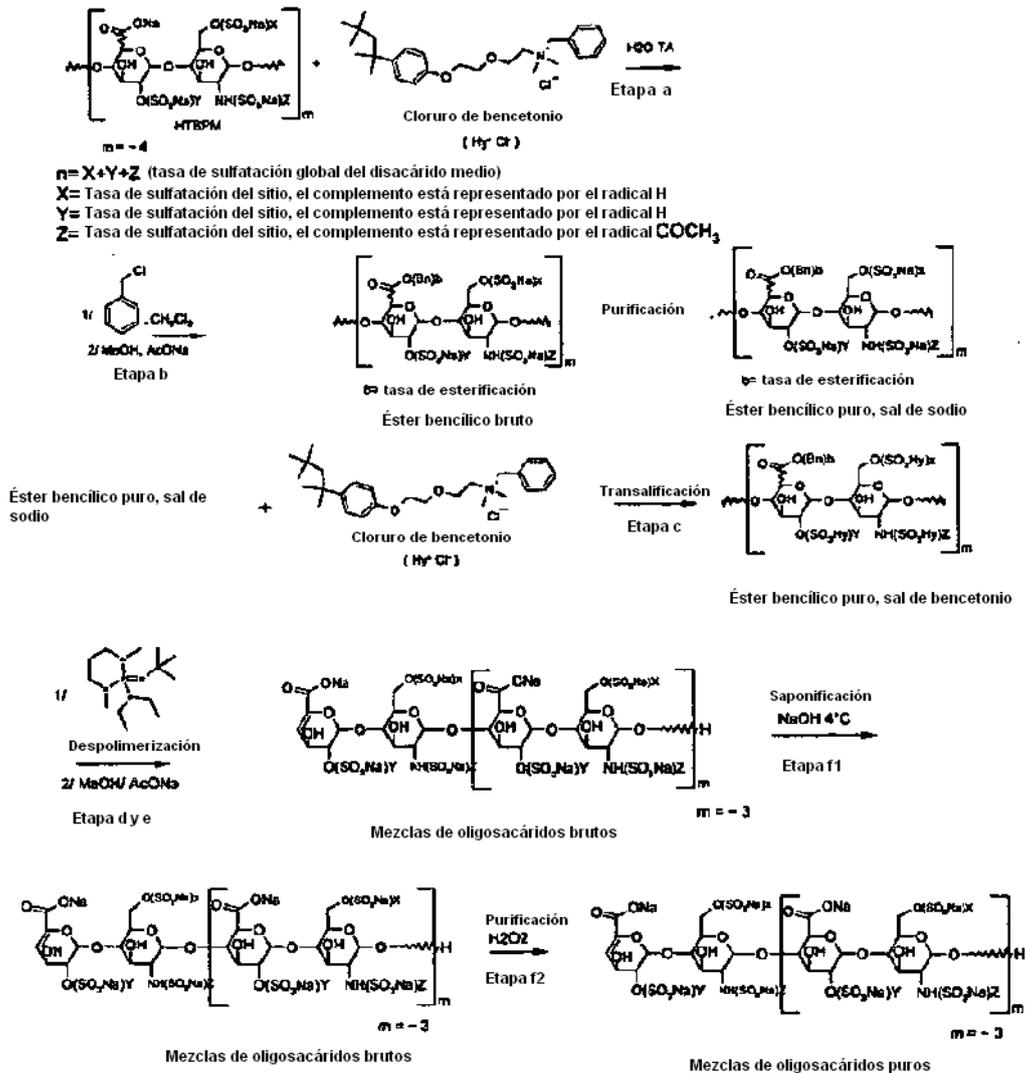
La actividad de las mezclas de oligosacárido según la invención se obtiene via un procedimiento muy particular que se expone a continuación. El experto en la técnica conoce muy bien que las características físico-químicas de las mezclas de polisacáridos así como la actividad que deriva de ellas están ligadas al procedimiento de obtención (J. Med Chem 33(6) 1639-2093 (1990)).

Las mezclas de oligosacáridos según la invención se preparan por despolimerización de una sal de amonio cuaternario del éster bencílico de una heparina de muy bajo peso molecular (HTBPM) en medio orgánico, preparándose esta (HTBPM) ella misma según la enseñanza de las solicitudes de patentes WO 02/08295 y WO2004/033503. Se trata de manera general, de redespolicerizar una heparina de muy bajo peso molecular que se ha obtenido ella misma de manera específica por despolimerización de la heparina esterificada en presencia de una base fuerte, preferentemente en diclorometano, y en presencia de un porcentaje de agua inferior a 3%.

Las HTPBM utilizadas como materia prima en esta invención se prepararon en particular según los procedimientos descritos en las solicitudes de patentes WO 02/08295 y WO2004/033503.

Las HTPBM utilizadas como producto de partida tienen principalmente una actividad aXa superior a 140 UI /mg una actividad aIIa inferior a 5 UI/mg y masas moleculares medias comprendidas entre 2.000 y 3.000 Daltons. La medida de las actividades aXa se realiza respecto a una HTBPM estándar con actividad medida de 158 UI/mg. La actividad de la HTBPM estándar se mide respecto al patrón internacional estándar de la heparina de bajo peso molecular.

Las HTPBM de partida obtenidas según el procedimiento tal como se ha descrito más arriba se redespolicerizan mediante una base orgánica fuerte con pKa preferentemente superior a 20 (propiedades preferentemente pertenecientes a la familia de los fosfacenos definidos por R. Schwesinger et al, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987) o R. Schwesinger et al, Angew. Chem. 105, 1420 (1993)). Se transforma la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la HTBPM despolimerizada en sal de sodio, se saponifican los ésteres residuales y opcionalmente se purifica el producto obtenido. El esquema de reacción siguiente ilustra la presente invención:



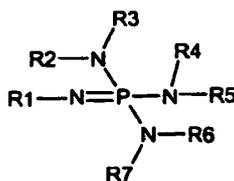
La invención tiene por lo tanto igualmente por objeto un procedimiento de preparación de las mezclas de oligosacáridos tales como se han definido más arriba **caracterizado porque** una heparina de muy bajo peso molecular, que tiene una actividad aXa superior a 140 UI/mg, una actividad aIIa inferior a 5 UI/mg y una masa molecular media comprendida entre 2.000 y 3.000 Daltons, se somete a las reacciones químicas siguientes:

- a) Transalifación por acción de cloruro de bencetonio para obtener el heparinato de bencetonio,
- b) Esterificación del heparinato de bencetonio obtenido por acción de cloruro de bencilo, y tratamiento con una disolución alcohólica de acetato de sodio para obtener la sal de sodio del éster bencílico de la heparina de muy bajo peso molecular,
- 5 c) Transalifación del éster bencílico obtenido y obtención de la sal de amonio cuaternario, preferentemente en sal de bencetonio, de cetil pirinio o de cetiltrimetil amonio,
- d) Despolimerización mediante una base orgánica fuerte con pka preferentemente superior a 20 con el fin de obtener una heparina de muy bajo peso molecular despolimerizada,
- 10 e) Transformación de la sal de amonio cuaternario de la heparina de muy bajo peso molecular despolimerizada en sal de sodio
- f) Saponificación de los ésteres residuales y opcionalmente purificación.

En la presente invención, se utiliza muy particularmente la fuerte selectividad de la base fosfaceno durante la etapa de despolimerización (etapa d) para enriquecer de forma inesperada la mezcla de oligosacáridos en secuencias afines a ATIII. Preferentemente, la relación en mol base fuerte/éster está comprendida entre 0,2 y 5 y, muy particularmente, entre 0,6 y 2.

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

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



20 en la que los radicales R₁ a R₇, idénticos o diferentes, representan radicales alifos lineales, ramificados o cíclicos que contienen de 1 a 6 átomos de carbono pudiendo formar R₃ y R₄, llegado el caso, con el grupo al que están unidos -N-P-N- un heterociclo de 6 eslabones. En particular, la invención tiene por objeto el procedimiento tal como se ha definido más arriba **caracterizado porque** la base utilizada durante la etapa d) de despolimerización es 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diaza-fosforina (nomenclatura oficial: 1,3,2-diazafosforin-2-amina, 2-[(1,1-dimetiletil)imino]-N,N-dietil-1,2,2,2,3,5,6-octahidro-1,3-dimetilo).

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

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

Consecuentemente, el procedimiento según la invención aplica una tasa de esterificación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina comprendida entre 40 y 100% y, preferentemente, entre 70 y 90%.

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

45 El equivalente en peso de acetato añadido es preferentemente 3 veces superior a la masa de sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina aplicada más adelante en la reacción de despolimerización. La sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la HTBPM obtenida es preferentemente la sal de bencetonio, de cetilpiridinio o de cetiltrimetil amonio.

La transalificación de la etapa c) se efectúa mediante un cloruro de amonio cuaternario y, preferentemente, mediante cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio o cloruro de cetiltrimetil amonio, en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre 10 y 25°C. De manera ventajosa, la relación en mol cloruro de amonio cuaternario/sal de sodio del éster bencilico de la heparina está comprendida entre 2,5 y 3,5.

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

10 El producto final puede purificarse opcionalmente por cualquier método conocido de purificación de las heparinas despolimerizadas (por ejemplo EP 0037319B1). Preferentemente, se purifica mediante peróxido de hidrógeno, en medio acuoso, a una temperatura de 10 a 50°C. Preferentemente, esta operación se realizará entre 20 y 40°C.

Las mezclas según la invención en forma de sal de sodio, pueden transformarse en otra sal de un metal alcalino o alcalinotérreo. Se pasa opcionalmente de una sal a otra utilizando el método descrito en la patente FR 73 13 580.

15 La presente invención permite principalmente un fuerte enriquecimiento en hexasacárido Δ IIa-II₂-Is. Cuando se re-despolimeriza una heparina de bajo peso molecular por el procedimiento que la ha generado, es muy conocido por el experto en la técnica que la actividad anti-Xa del producto obtenido disminuye fuertemente hasta ser nula. En el caso en el que se utilizan los procedimientos que permiten la obtención de la Enoxaparina, Fraxiparina, Fragmina, Innohep (o Logiparina), Normiflo, Embollex (o Sandoparina), Fluxum (o Minidaltón), Clivarina e Hibor, se puede observar este fenómeno si se re-despolimerizan estas HBPM con su procedimiento de origen. Esto es la consecuencia de la baja selectividad de estos procedimientos frente a la conservación de los sitios ATIII.

20 En la presente invención, si se utiliza como materia prima una HTBPM obtenida con el procedimiento de despolimerización fosfaceno, el que se produce es exactamente el fenómeno inverso. La actividad aXa de la mezcla de oligosacárido aumenta y sobrepasa incluso la de la heparina que ha servido para preparar la HTBPM. Esto es la consecuencia probable de la selectividad notable de las bases fosfacenos sobre la conservación de las secuencias afines a ATIII.

25 Esta característica del procedimiento también se observa a través de masas moleculares medias de la mezcla de oligosacáridos obtenidos. A título de ejemplo, cuando se despolimeriza una HTBPM de masa molecular media de 2.400 Daltons, se obtiene una mezcla de oligosacáridos de masa molecular media de 2.000 Da. Se constata que las secuencias afines a ATIII (hexasacáridos y octasacáridos) se conservan de la acción de la base fosfaceno, lo que conlleva la destrucción y la eliminación de las demás secuencias, y como consecuencia, una masa molecular media que va a tender a la masa molecular media de la entidad no despolimerizable; es decir, el hexasacárido Δ IIa-II₂-Is (1.834 g/mol). Debe subrayarse que en la etapa de despolimerización de la heparina con una base fosfaceno, se pasa de una masa molecular media de aproximadamente 15.000 Da a aproximadamente 2.400 Da.

30 A título de método alternativo, el procedimiento según la invención que permite aumentar la actividad y la selectividad para al factor Xa es igualmente aplicable a las heparinas de bajo peso molecular en general. A título de ejemplo, se citarán por ejemplo la Enoxaparina, Fraxiparina, Fragmina, Innohep (o Logiparina), Normiflo, Embollex (o Sandoparina), Fluxum (o Minidaltón), Clivarina e Hibor. Se puede tratar igualmente de determinadas heparinas de muy bajo peso molecular tales como las descritas en US 6.384.021 (2.000 - 4.000 Da) o WO 02/08295 (1.500 a 3.000 Da) que tienen una actividad anti-Xa que presentan una actividad anti-Xa inferior a 140 UI/mg. (principalmente comprendida entre 100 y 40 140 UI/mg)

Esta característica del procedimiento se traduce en la obtención de actividades anti-Xa inesperadas respecto al peso molecular medio de las mezclas de oligosacáridos ($190 \text{ UI/mg} < aXa < 450 \text{ UI/mg}$; $1.800 \text{ Da} < PM < 2.400 \text{ Da}$).

45 Según un modo particular de la invención, la selectividad frente al factor Xa de las mezclas de oligosacáridos también puede aumentarse eliminando las fracciones disacáridas y tetrasacáridas (fracciones que no se unen específicamente a ATIII). La mezcla, en este caso, se cromatografía en columnas rellenas con gel de tipo poliacrilamida agarosa o un gel de poliacrilamida. La mezcla se eluye con una disolución de hidrógenocarbonato de sodio. Preferentemente, la disolución de hidrógenocarbonato de sodio es una disolución de 0,1 moles/ l a 1 mol/l. Aún más preferentemente, la separación se realiza a una concentración de 1 mol/l. La detección se realiza por espectrometría UV (254nm). Después de eliminar las fracciones disacáridas y tetrasacáridas, la mezcla de oligosacáridos en disolución en hidrógenocarbonato de sodio se neutraliza con ácido acético glacial. La disolución se concentra bajo presión reducida de forma que se 50 obtiene una concentración de acetato de sodio superior a 20% en peso. La mezcla de oligosacáridos se precipita por adición de 3 a 5 volúmenes de metanol. La mezcla de oligosacáridos altamente afín se recupera por filtración. Si se considera necesario, puede purificarse por desalado en una columna apropiada. El ejemplo 6 ilustra este método alternativo y permite obtener heparinas de muy bajo peso molecular cuya actividad anti-Xa es superior a 400 UI/mg.

55 La invención tiene igualmente por objeto un procedimiento tal como se ha definido más arriba de preparación de mezclas de oligosacáridos que poseen una selectividad frente al factor Xa de las mezclas de oligosacáridos aumentada **caracterizado porque** además se eliminan las fracciones disacáridas y tetrasacáridas por cromatografía principalmente en columnas rellenas de gel de tipo poliacrilamida agarosa.

Las mezclas según la invención pueden utilizarse a título de medicamentos.

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

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

Las composiciones farmacéuticas son por ejemplo disoluciones inyectables por vía subcutánea o intravenosa. Otras composiciones farmacéuticas según la invención se aplican igualmente para una administración por vía pulmonar (inhalación) o por vía oral.

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

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, no obstante, sin limitarla.

Preparación 1: Obtención de una heparina de muy bajo peso molecular de partida que presenta una actividad aXa igual a 158,8 IU/mg

20 La heparina de muy bajo peso molecular (HTBPM) utilizada a título de producto de partida para el ejemplo 1 se prepara según la solicitud de patente WO2004/033503 a partir de heparina de sodio aplicando las etapas a a f tales como se han definido más arriba, efectuándose la etapa de despolimerización en presencia de 2-terc-butylimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diaza-fosforina en presencia de un porcentaje de agua inferior a 0,6%.

Características de la heparina de muy bajo peso molecular obtenida

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

25 Peso molecular medio: 2.400 Daltons

Actividad anti-Xa: 158,8 UI/mg

Actividad anti-IIa: 3,1 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 51

30 **Preparación 2: Obtención de una heparina de muy bajo peso molecular de partida que presenta una actividad aXa igual a 158 IU/mg**

La heparina de muy bajo peso molecular (HTBPM) utilizada a título de producto de partida para los ejemplos 2, 3, 4, 5 se prepara según la solicitud de patente WO2004/033503 a partir de heparina de sodio aplicando las etapas a a f tales como se han definido más arriba, efectuándose la etapa de despolimerización en presencia de 2-terc-butylimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diaza-fosforina en presencia de un porcentaje de agua inferior a 0,6%.

35 **Características de la heparina de muy bajo peso molecular obtenida**

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

Peso molecular medio: 2.450 Daltons

Actividad anti-Xa: 158 UI/mg

Actividad anti-IIa: 2,1 UI/mg

40 Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 75

Preparación 3: HTBPM, sal de bencetonio

Trans-salificación de la HTBPM en sal de bencetonio (correspondiente a la etapa a) del procedimiento):

Se cargan 12,53 g (20,7 mmoles) de HTBPM sal de sodio obtenida según la preparación 1 en un erlenmeyer A de 500 ml y se solubilizan en 85 ml de agua (disolución amarilla).

Se cargan 31,62 g (70,5 mmoles) de cloruro de bencetonio en un erlenmeyer B de 100 ml con 250 ml de agua (disolución incolora).

5 El contenido de B se vierte en A y la mezcla se agita aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Se deja sedimentar durante aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (250 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 30 minutos. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (250 ml). La mezcla se agita aproximadamente 15 minutos y se filtra. La torta se lava 3 veces con 200 ml de agua. El sólido beige húmedo se filtra con succión y se seca a 80°C durante aproximadamente 18 h en estufa bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 35,56 g de HTBPM sal de bencetonio.

10 El rendimiento obtenido es 89%.

Preparación 4

Trans-salificación de la HTBPM en sal de bencetonio (correspondiente a la etapa a) del procedimiento):

Se cargan 17,93 g (30,2 mmoles) de HTBPM sal de sodio obtenida según la preparación 2 en un erlenmeyer A de 1 l y se solubilizan en 120 ml de agua (disolución amarilla).

15 Se cargan 45 g (0,1 mmoles) de cloruro de bencetonio en un erlenmeyer B de 500 ml con 360 ml de agua (disolución incolora).

20 El contenido de B se vierte en A y la mezcla se agita aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Se deja sedimentar durante aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (500 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 30 minutos. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (500 ml). La mezcla se agita aproximadamente 15 minutos y se filtra. La torta se lava 3 veces con 200 ml de agua. El sólido beige húmedo se filtra con succión y se seca a 80°C durante aproximadamente 48 h en estufa bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 49,5 g de HTHPM sal de bencetonio.

El rendimiento obtenido es 87%.

Ejemplo 1:

Heparina de muy bajo peso molecular (HTBPM) obtenida por el procedimiento según la invención que comprende una etapa de esterificación al 77% y una etapa de despolimerización con una base derivada de fosfaceno en medio anhidro

. Esterificación de la HTBPM (etapa b del procedimiento):

30 Se solubilizan 35,39 g (18,3 mmoles) de HTBPM sal de bencetonio obtenida según la preparación 3 (con un contenido en agua de 0,20%) en 183,3 g de diclorometano seco y se cargan en un matraz de tres bocas de 500 ml. Se añaden 29,5 ml (25,7 mmoles) de cloruro de bencilo a la temperatura de 30°C. La tasa de esterificación es de 77% después de aproximadamente 23 h de reacción a 30°C. Después de enfriar a temperatura ambiente (22±3°C), la mezcla de reacción se vierte sobre 490 ml de una disolución de acetato de sodio al 10% en metanol. La mezcla se agita durante aproximadamente 1 h y se deja sedimentar aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (250 ml). Se agita aproximadamente 30 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 45 minutos. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (250 ml). Se deja sedimentar aproximadamente 16 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (350 ml). Se agita durante aproximadamente 5 minutos y la suspensión se filtra. La torta se lava 2 veces con 50 ml de metanol, se filtra con succión y se seca a 40°C bajo presión reducida (6 kPa) durante aproximadamente 18 h. Se obtienen 34,48 g de HTBPM éster de bencilo sal de sodio bruto con una tasa de esterificación de 77%.

. Purificación de la HTBPM éster de bencilo sal de sodio (etapa b) del procedimiento).

45 Los 34,48 g de HTBPM éster de bencilo sal de sodio brutos se solubilizan en 350 ml de una disolución acuosa de NaCl al 10%. La disolución se vierte sobre 1,57 l de metanol. La suspensión se agita durante aproximadamente 40 minutos y se deja sedimentar durante aproximadamente 16 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (1,5 l). Se agita aproximadamente 1 h y se deja sedimentar durante aproximadamente 1,5 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (1,2 l). Se agita aproximadamente 15 minutos y se filtra. La torta se lava 3 veces con 50 ml de metanol. El sólido húmedo blanco se filtra con succión y se seca a 40°C bajo presión reducida (6 kPa) durante aproximadamente 18 h. Se obtienen 6,07 g de HTBPM éster de bencilo sal de sodio.

50 El rendimiento de la esterificación es 50%.

. Trans-salificación de la HTBPM éster de bencilo, sal de sodio en sal de bencetonio (etapa c) del procedimiento):

Se solubilizan 6 g (9,14 mmoles) de HTBPM éster de bencilo sal de sodio con 40 ml de agua en un erlenmeyer A de 250 ml.

- 5 Durante este tiempo, se cargan 13,93 g (31 mmoles) de cloruro de bencetonio con 110 ml de agua en un erlenmeyer B de 250 ml.

10 El contenido de B se vierte en A. La suspensión se agita aproximadamente 1 h a temperatura ambiente ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) y se deja sedimentar 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (140 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (140 ml). Se agita aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar del orden de 30 minutos. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (140 ml). Se agita aproximadamente 5 minutos y se filtra. La torta se lava 3 veces con 50 ml de agua, se filtra con succión y se seca a 80°C bajo presión reducida (6 kPa) durante aproximadamente 18 h. Se obtienen 17,43 g de HTBPM éster de bencilo, sal de bencetonio.

El rendimiento es 100%.

15 . Despolimerización de la HTBPM éster de bencilo, sal de bencetonio en medio anhidro: Contenido en agua no detectable < 0,01% (etapa d) del procedimiento)

Se cargan 17,43 g (9,14 mmoles) de HTBPM según la preparación 2 en un matraz de tres bocas de 250 ml con 122 ml de diclorometano seco. Se añaden 17,4 g de tamiz molecular 4 Å. El conjunto se agita durante aproximadamente 18h a temperatura ambiente ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) bajo atmósfera de argón.

- 20 El tamiz se separa de la mezcla por transferencia de la disolución a un matraz de tres bocas de 250 ml. Se añaden 2,64 ml (9,14 mmoles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diaza-fosforina y se agita durante 24 h a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ bajo atmósfera de argón.

. Transformación de la sal de amonio cuaternario en sal de sodio (etapa e) del procedimiento)

25 Durante este tiempo, se preparan 730 ml de una disolución metanólica de acetato de sodio al 10% en un erlenmeyer de 21. Se añaden a la disolución 8,71 g de celite Hyflo supercel. La mezcla de reacción se vierte en la disolución metanólica manteniendo la temperatura a aproximadamente 4°C . La suspensión se agita durante aproximadamente 15 minutos a esta temperatura. Se deja sedimentar aproximadamente 45 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (450 ml). Se agita 15 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 45 minutos. El sobrenadante se desecha de nuevo y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (420 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se filtra sobre vidrio sinterizado n° 3. La torta se lava 2 veces con 70 ml de metanol, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h a 50°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 4,35 g de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio) en celite (8,71 g).

El rendimiento es 72,5%.

. Saponificación de la HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio (etapa f1) del procedimiento):

35 Se solubilizan 4,35 g (6,63 mmoles) de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio) en celite en 46 ml de agua y se filtra sobre vidrio sinterizado n° 3. El celite se lava con 2 partes de 30 ml de agua. El filtrado se carga en un erlenmeyer de 500 ml. Se introducen 823 μl (9,94 mmoles) de polvo de sosa al 35% a una temperatura cercana a 4°C . Se agita durante aproximadamente 3 h a esta temperatura. El medio se neutraliza por adición de una disolución de HCl 1N y se añaden 11,5 g de NaCl y 80 ml de metanol. Después de aproximadamente 15 minutos de agitación, se añaden 210 ml de metanol. La suspensión se agita durante aproximadamente 1 h y se deja sedimentar 30 minutos. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (230 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar 30 minutos. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (210 ml). Se agita aproximadamente 15 minutos y se filtra. La torta se lava 2 veces con 9 ml de metanol, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h a 50°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 2,95 g de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio).

45 El rendimiento es 73,7%.

f) Purificación de la HTBPM despolimerizada bruta -sal de sodio- (etapa f2 del procedimiento):

50 Se cargan 1,5 g de HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio en un matraz de tres bocas de 50 ml con 16 ml de agua. La disolución se lleva durante aproximadamente 10 minutos a 40°C . El pH se lleva a aproximadamente 9,7 por adición de sosa 0,1 N. La disolución se filtra sobre membrana 0,45 μm y se añaden 84 μl de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. La mezcla se agita 2 h a temperatura ambiente manteniendo el pH constante a $9,7 \pm 0,1$ por adición de sosa 0,1 N. La mezcla de reacción se neutraliza con HCl 0,1 N y se añaden 2 g de NaCl. Después de aproximadamente 10 minutos de agitación, la disolución se filtra sobre membrana 0,45 μm . Se vierten 14 ml de metanol a una temperatura cercana a 4°C . La disolución se agita aproximadamente durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se añaden 36 ml de metanol y la suspensión se agita durante aproximadamente 1 h. La agitación se para y se deja sedimentar durante aproximadamente 30 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (40 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 40 ml de metanol y se agita durante aproximadamente 10 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado aproximadamente 30 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (45 ml). Se añaden 45 ml de metanol y el precipitado en suspensión se filtra. La torta blanca obtenida se lava con 2 partes de 3 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de aproximadamente 18 horas de secado, se obtienen 1,303 g de HTBPM despolimerizada pura (sal de sodio).

El rendimiento obtenido es 86,8%.

10 **g) Característica de la HTBPM despolimerizada así obtenida**

Peso molecular medio: 1.950 Daltons

Índice de polidispersidad: 1,1

Actividad anti-Xa: 283 U/mg

Actividad alla: no detectable (< 0,2 U/mg)

15 **Ejemplo 2:**

Heparina de muy bajo peso molecular (HTBPM) obtenida por el procedimiento según la invención que comprende una etapa de esterificación al 49% y una etapa de despolimerización con una base derivada de fosfaceno en medio anhidro

. Esterificación de la HTBPM (etapa b del procedimiento):

Se solubilizan 13,29 g (7,6 mmoles) de HTBPM sal de bencetonio obtenida según la preparación 4 en 70,43 g de diclorometano anhidro y se cargan en un matraz de tres bocas de 100 ml (El contenido en agua del medio de reacción es 0,073%). Se añaden 12,3 ml (107 mmoles) de cloruro de bencilo a la temperatura de 30°C. La tasa de esterificación es de 49% después de aproximadamente 7 h de reacción a 30°C. Después de enfriar, la mezcla de reacción se vierte sobre 160 ml de una disolución al 12% de acetato de sodio en metanol. La mezcla se agita 1 h a temperatura ambiente y se deja sedimentar durante aproximadamente 16 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (100 ml). Se agita aproximadamente 1 h y se deja sedimentar aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha de nuevo y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (100 ml). Se agita aproximadamente 5 minutos y se filtra. La torta se lava con 2x40 ml de metanol, se filtra con succión y se seca en estufa a 40°C bajo presión reducida (6 kPa) durante aproximadamente 18 h. Se obtienen 3,90 g de HTBPM éster de bencilo sal de sodio bruta con una tasa de esterificación de 49%.

30 **. Purificación de la HTBPM éster de bencilo (esterificada al 49%) sal de sodio (etapa b del procedimiento).**

Se solubilizan 3,90 g de HTBPM éster de bencilo sal de sodio brutos en 39 ml de una disolución acuosa de NaCl al 10%. La disolución se vierte sobre 176 ml de metanol. La suspensión se agita durante aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar 2 h. Se filtra la mezcla. La torta se pone en suspensión en 175 ml de metanol y se agita durante 10 minutos. Se filtra y la torta se lava con 2 partes de 10 ml de metanol. El sólido húmedo blanco se filtra con succión y se seca en estufa a 40°C bajo presión reducida (6 kPa) durante aproximadamente 18 h. Se obtienen 2,62 g de HTBPM éster de bencilo sal de sodio.

El rendimiento global de la fase de esterificación es 57,3%.

. Trans-salificación de la HTBPM éster de bencilo en sal de bencetonio (etapa c) del procedimiento):

Se solubilizan 2,62 g (4,37 mmoles) de HTBPM éster de bencilo sal de sodio en 20 ml de agua (erlenmeyer « A »). Durante este tiempo, se cargan 5,92 g (13,2 mmoles) de cloruro de bencetonio con 60 ml de agua en un erlenmeyer « B ». El contenido de « B » se vierte en « A ». La suspensión se agita durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente y se deja sedimentar 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (70 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (70 ml). Se agita aproximadamente 5 minutos y se filtra. La torta se lava con 3 partes de 50 ml de agua, se filtra con succión y se seca en estufa a 80°C bajo presión reducida (6 kPa) durante aproximadamente 18 h. Se obtienen 6,85 g de HTBPM éster de bencilo sal de bencetonio.

El rendimiento es 99%. El contenido en agua de la sal de bencetonio es 0,6%.

. Despolimerización de la HTBPM éster de bencilo, sal de bencetonio:

Se cargan 6,80 g (4,3 mmoles) de HTBPM en un matraz de tres bocas de 100 ml con 54 ml de diclorometano seco. La mezcla se lleva a 30°C y se agita hasta la disolución completa. El contenido en agua estimado de la mezcla de reacción

es de aproximadamente 0,05%. Se añaden 1,25 ml (4,3 mmoles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3,2-diaza-fosforina y se agita 24 h a 30°C bajo atmósfera inerte.

. Transformación de la sal de amonio cuaternario en sal de sodio (etapa e) del procedimiento)

5 Durante este tiempo, se preparan 270 ml de una disolución metanólica de acetato de sodio al 10% en un erlenmeyer de 1 l. La mezcla de reacción se vierte en la disolución metanólica manteniendo la temperatura a aproximadamente 4°C. La suspensión se agita aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Se deja sedimentar durante 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (165 ml). Se agita aproximadamente 1 h y se deja sedimentar 1 h. El sobrenadante se desecha de nuevo y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (170 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se filtra. La torta se lava con 3 partes de 40 ml de metanol, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h en estufa a 50°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 2,29 g de HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio.

El rendimiento obtenido es 89%.

. Saponificación de la HTBPM bruta, sal de sodio (etapa f1 del procedimiento):

15 Se solubilizan 2,29 g (3,8 mmoles) de HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio en 23 ml de agua. La disolución se filtra sobre membrana de 0,8 µm y se carga en un matraz de tres bocas de 100 ml. Se introducen 575 µl (5,73 mmoles) de polvo de sosa al 30% a una temperatura cercana a 3 °C. Se agita durante aproximadamente 2 h a esta temperatura.

20 La mitad de la mezcla de reacción se neutraliza por adición de ácido acético glacial y se añaden 367 mg de acetato de sodio sólido y 13 ml de metanol. La disolución se agita aproximadamente 15 minutos y se añaden 65 ml de metanol. La suspensión obtenida se agita aproximadamente 30 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 16 horas. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (36 ml). Se agita aproximadamente 30 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 30 minutos. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (16 ml). Se agita aproximadamente 15 minutos y se filtra sobre membrana de 0,22 µm. La torta se lava 2 veces con 5 ml de metanol, se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa) durante aproximadamente 18 h en estufa a 50°C. Se obtienen 563 mg de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio).

25 El rendimiento es 52,6%.

. Purificación de la HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio) precipitada con AcONa (etapa f2 del procedimiento):

30 Se cargan 560 mg de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio) en un matraz de tres bocas de 10 ml con 5,6 ml de agua. La disolución marrón se lleva 10 minutos a 40°C. El pH se lleva a 9,7 por adición de sosa 0,1 N. La disolución se filtra sobre membrana 0,45 µm y se añaden 28 µl de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. La mezcla se agita 2 h a temperatura ambiente manteniendo el pH constante a $9,5 \pm 0,1$ por adición de sosa 0,1 N. La mezcla de reacción se neutraliza con HCl 0,1 N y se añaden 620 mg de NaCl. Después de 10 minutos de agitación, la disolución se filtra sobre membrana 0,45 µm. Se vierten 4,35 ml de metanol a una temperatura cercana a 4 °C. La disolución se agita 15 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 11,2 ml de metanol. La suspensión se agita 1 h. La agitación se para y se deja sedimentar durante 1 h. El sobrenadante se recoge y se desecha (13,5 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 13,5 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (13 ml). Se añaden 13 ml de metanol y el precipitado en suspensión se filtra. La torta blanca obtenida se lava con 2 partes de 5 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 376 mg de HTBPM despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 67%.

Característica de la HTBPM despolimerizada así obtenida

Actividad anti-Xa: 191UI/mg

Peso molecular medio: 2.100 Da

Ejemplo 3:

45 Heparina de muy bajo peso molecular (HTBPM) obtenida por el procedimiento según la invención que comprende una etapa de esterificación al 73% y una etapa de despolimerización con una base derivada de fosfaceno en medio anhidro

. Esterificación de la HTBPM (etapa b del procedimiento):

50 Se solubilizan 13,7 g (7,3 mmoles) de HTBPM sal de bencetonio obtenida según la preparación 4 en 73,67 g de diclorometano anhidro y se cargan en un matraz de tres bocas de 100 ml. (El contenido en agua del medio de reacción se dosifica a 0,23%). Se añaden 13 ml (113 mmoles) de cloruro de bencilo a la temperatura de 30°C. La tasa de esterificación es de 73% después de aproximadamente 20 h de reacción a 30°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vierte sobre 210 ml de una disolución al 12% de acetato de sodio en metanol. La mezcla se agita 30 minutos a temperatura ambiente y se deja sedimentar durante aproximadamente 1,5 h. El

sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (140 ml). Se agita 15 minutos y la suspensión se filtra. La torta se lava con 2 partes de 100 ml de metanol, se filtra con succión y se seca aproximadamente 18 h en estufa a 40°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 13,3 g de HTBPM éster de bencilo sal de sodio bruta con una tasa de esterificación de 73%.

5 **. Purificación de la HTBPM éster de bencilo (esterificada al 73%), sal de sodio (etapa b del procedimiento).**

Los 13,3 g de HTBPM éster de bencilo sal de sodio brutos se solubilizan en 133 ml de una disolución acuosa de NaCl al 10%. La disolución se vierte sobre 600 ml de metanol. La suspensión se agita durante aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (400 ml). Se agita durante aproximadamente 5 minutos y se filtra. La torta se lava 3 veces con 100 ml de metanol. El sólido húmedo blanco se filtra con succión y se seca aproximadamente 18 h en estufa a 40°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 2,33 g de HTBPM éster de bencilo sal de sodio.

El rendimiento de la esterificación es 49,6%.

. Trans-salificación de la HTBPM éster de bencilo, sal de bencetonio (etapa c del procedimiento):

15 Se solubilizan 2,27 g (3,53 mmoles) de HTBPM éster de bencilo sal de sodio con 15 ml de agua en un erlenmeyer « A » de 100 ml. Durante este tiempo, se cargan 5,22 g (11,6 mmoles) de cloruro de bencetonio con 55 ml de agua en un erlenmeyer « B » de 100 ml.

20 El contenido de « B » se vierte en « A ». La suspensión se agita aproximadamente 1 h a temperatura ambiente y se deja sedimentar aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (50 ml). Se agita aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (50 ml). Se agita 5 minutos más y se filtra. La torta se lava con 3 partes de 50 ml de agua, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h en estufa a 80°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 5,67 g de HTBPM éster de bencilo sal de bencetonio.

El rendimiento obtenido es 98%. El contenido en agua del producto obtenido es 1%.

. Despolimerización de la HTBPM éster de bencilo, sal de bencetonio (etapa d del procedimiento):

25 Se cargan 5,45 g (3,3 mmoles) de HTBPM en un matraz de tres bocas de 100 ml con 40 ml de diclorometano seco. El contenido en agua estimado de la mezcla es aproximadamente 0,1%. La mezcla se lleva a 30°C. Se añaden 958 µl (3,3 mmoles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diaza-fosforina y se agita 24 h a 30°C bajo atmósfera de argón.

. Transformación de la sal de amonio cuaternario en sal de sodio (etapa e) del procedimiento)

30 Durante este tiempo, se preparan 200 ml de una disolución metanólica de acetato de sodio al 10% en un erlenmeyer de 500 ml. La mezcla de reacción se vierte en la disolución metanólica manteniendo la temperatura a aproximadamente 4°C. La suspensión se agita durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Se deja sedimentar aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (150 ml). Se agita aproximadamente 30 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 30 minutos. El sobrenadante se desecha de nuevo y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (150 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se filtra. La torta se lava 3 veces con 50 ml de metanol, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h a 50°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 1,40 g de HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio. El rendimiento obtenido es 65,8%.

. Saponificación de la HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio (etapa f1 del procedimiento):

40 Se solubilizan 1,40 g (2,18 mmoles) de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio) en 14 ml de agua. La disolución se carga en un matraz de tres bocas de 100 ml. A una temperatura cercana de 4°C, se introducen 351 µl (3,5 mmoles) de polvo de sosa al 30%. Se agita durante aproximadamente 2 h a esta temperatura. La disolución se neutraliza por adición de ácido acético glacial (100%). Se añaden 7 g de acetato de sodio sólido y 130 ml de metanol. La suspensión se agita 30 minutos y se deja sedimentar durante aproximadamente 1 hora. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (80 ml). Se agita aproximadamente 30 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 16 horas. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (80 ml). Se agita del orden de 15 minutos y se filtra sobre membrana de 0,45 µm. La torta se lava 2 veces con 10 ml de metanol, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h a 50°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 1,15 g (rendimiento: 89,4%) de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio).

50 El rendimiento obtenido es 89,4%.

. Purificación de la HTBPM despolimerizada bruta -sal de sodio - (etapa f2 del procedimiento):

Se cargan 373 mg de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio) en un matraz de tres bocas de 10 ml con 3,7 ml de agua. La disolución se lleva 10 minutos a 40°C. El pH se lleva a aproximadamente 9,5 por adición de sosa 1 N. La

disolución se filtra sobre membrana 0,45 µm y se añaden 18 µl de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. La mezcla se agita aproximadamente 2 h a temperatura ambiente manteniendo el pH constante a $9,5 \pm 0,1$ por adición de sosa 0,1 N. La mezcla de reacción se neutraliza con HCl 0,1 N y se añaden 430 mg de NaCl. Después de aproximadamente 10 minutos de agitación, la disolución se filtra sobre membrana 0,45 µm. Se vierten 3 ml de metanol a una temperatura cercana a 4 °C. La disolución se agita 15 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 7,7 ml de metanol. La suspensión se agita durante aproximadamente 1h. La agitación se para y se deja sedimentar durante aproximadamente 40 minutos. El sobrenadante se recoge y se desecha (10 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se añaden 10 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Se deja re-sedimentar el precipitado 30 minutos aproximadamente. El sobrenadante se recoge y se desecha (10 ml). Se añaden 10 ml de metanol y el precipitado en suspensión se filtra sobre membrana 0,45 µm. La torta blanca obtenida se lava con 4 partes de 5 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de aproximadamente 18 horas de secado, se obtienen 199 mg de HTBPM despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 54%.

Característica de la HTBPM despolimerizada así obtenida

15 Peso molecular medio: 2.000 Daltons. Índice de polidispersidad: 1,1

Actividad anti-Xa: 252 UI/mg

Ejemplo 4:

HTBPM obtenida por el procedimiento según la invención que comprende una etapa de esterificación al 96% y una etapa de despolimerización con BEMP

20 . Esterificación de la HTBPM (etapa b) del procedimiento)

Se solubilizan 14,45 g (7,7 mmoles) de HTBPM sal de bencetonio obtenida según la preparación 4 en 75,79 g de diclorometano anhidro y se cargan en un matraz de tres bocas de 250 ml. (El contenido en agua del medio de reacción es de 0,20%). Se añaden 12,4 ml (108 mmoles) de cloruro de bencilo a la temperatura de 30°C. La tasa de esterificación es 96% después de aproximadamente 26 h de reacción a 30°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vierte sobre 180 ml de una disolución al 12% de acetato de sodio en metanol. La mezcla se agita aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente y se deja sedimentar aproximadamente 30 minutos. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (150 ml). Se agita aproximadamente 15 minutos y se filtra. La torta se lava con 2 partes de 100 ml de metanol, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h a 40°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 3,67 g de HTBPM éster de bencilo, sal de sodio bruta, con una tasa de esterificación de 96%.

. Purificación de la HTBPM éster de bencilo (esterificada al 96%) sal de sodio (etapa b) del procedimiento):

Los 3,67 g de HTBPM éster de bencilo, sal de sodio bruta se solubilizan en 37 ml de una disolución acuosa de NaCl al 10% (3,7 g de NaCl en 37 ml de agua). La disolución se vierte sobre 167 ml de metanol. La suspensión se agita aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar durante aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de metanol (38 ml). Se agita durante aproximadamente 5 minutos y se filtra. La torta se lava 2 veces con 30 ml de metanol. El sólido húmedo blanco se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h a 40°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 2,76 g de HTBPM éster de bencilo, sal de sodio.

El rendimiento de la esterificación es 54,4%.

40 . Trans-salificación de la HTBPM éster de bencilo en sal de bencetonio (etapa c) del procedimiento):

Se solubilizan 2,83 g (4,29 mmoles) de HTBPM éster de bencilo, sal de sodio con 20 ml de agua en un erlenmeyer « A » de 100 ml. Durante este tiempo, se cargan 6,35 g (14,2 mmoles) de cloruro de bencetonio con 50 ml de agua en un erlenmeyer « B » de 100 ml.

El contenido de « B » se vierte en « A ». La suspensión se agita aproximadamente 1 h a temperatura ambiente y se deja sedimentar aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (60 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por el mismo volumen de agua (60 ml). Se agita durante aproximadamente 5 minutos y se filtra. La torta se lava 4 veces con 50 ml de agua, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h a 80°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 7,0 g de HTBPM éster de bencilo, sal de bencetonio.

50 El rendimiento observado es de aproximadamente 100%. El contenido en agua es 0,23%.

. Despolimerización de la HTBPM éster de bencilo, sal de bencetonio (etapa d) del procedimiento):

Se cargan 3,67 g (2,3 mmoles) de HTBPM en un matraz de tres bocas de 50 ml con 27 ml de diclorometano seco. La mezcla se lleva a 30°C. Se añaden 676 µl (2,3 mmoles) de 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3,2-diaza-fosforina y se agita 24 h a 30°C.

5 . Transformación de la sal de amonio cuaternario en sal de sodio (etapa e) del procedimiento)

Durante este tiempo, se preparan 150 ml de una disolución metanólica de acetato de sodio al 10% en un erlenmeyer de 250 ml. La mezcla de reacción se vierte en la disolución metanólica manteniendo la temperatura a aproximadamente 4°C. La suspensión se agita durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Se deja sedimentar durante aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (100 ml). Se agita 10 30 minutos y se deja sedimentar 30 minutos. El sobrenadante se desecha de nuevo y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (100 ml). Se agita 15 minutos y se filtra. La torta se lava 3 veces con 40 ml de metanol, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h a 50°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 966 mg de HTBPM despolimerizada, sal de sodio.

El rendimiento obtenido es 64%.

15 . Saponificación de la HTBPM éster de bencilo, sal de sodio (etapa f1 del procedimiento):

Se solubilizan 942 mg (1,43 mmoles) de HTBPM despolimerizada sal de sodio en 9,5 ml de agua. La disolución se carga en un matraz de tres bocas de 100 ml. Se introducen 236 µl (2,35 mmoles) de polvo de sosa al 30% a una temperatura cercana a 4 °C. Se agita durante aproximadamente 2 h a esta temperatura. La disolución se neutraliza por adición de ácido acético glacial (100%). Se añaden 4,5 g de acetato de sodio sólido y 85 ml de metanol. La suspensión se agita durante aproximadamente 30 minutos y se deja sedimentar durante aproximadamente 1 hora. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (40 ml). Se agita durante aproximadamente 30 minutos y se deja sedimentar durante aproximadamente 16 horas. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (40 ml). Se agita durante aproximadamente 30 minutos y se filtra sobre membrana de 0,45 µm. La torta se lava 2 veces con 10 ml de metanol, se filtra con succión y se seca durante aproximadamente 18 h a 50°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 776 mg de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio).

El rendimiento obtenido es 91,4%.

. Purificación de la HTBPM despolimerizada bruta -sal de sodio - etapa f2 del procedimiento:

Se cargan 758 mg de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio) en un matraz de tres bocas de 25 ml con 7,6 ml de agua. La disolución se lleva 10 minutos a 40°C. El pH se lleva a aproximadamente 9,5 por adición de sosa 0,1 N. La disolución se filtra sobre membrana 0,45 µm y se añaden 38 µl de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. La mezcla se agita durante aproximadamente 2 h a temperatura ambiente manteniendo el pH constante a $9,5 \pm 0,1$ por adición de sosa 0,1 N. La mezcla de reacción se neutraliza con HCl 1 N y se añaden 880 mg de NaCl. Después de aproximadamente 10 minutos de agitación, la disolución se filtra sobre membrana 0,45 µm. Se vierten 6,2 ml de metanol a una temperatura cercana a 4 °C. La disolución se agita aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 16 ml de metanol y la suspensión se agita durante aproximadamente 1 h. La agitación se para y la suspensión se filtra. La torta se lava con 2 partes de 15 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de aproximadamente 18 horas de secado, se obtienen 490 mg de HTBPM despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 65%.

Característica de la HTBPM despolimerizada así obtenida

40 Peso molecular medio: 2.000 Daltons

Índice de polidispersidad: 1,1

Actividad anti-Xa: 205 UI/mg

Ejemplo 5:

45 HTBPM obtenida por el procedimiento según la invención que comprende una etapa de esterificación al 96% y una etapa de despolimerización con terc-Butilimino-tris(dimetilamino) fosforano.

. Despolimerización de la HTBPM éster de bencilo, sal de bencetonio (etapa d) del procedimiento):

50 Se cargan 3,67 g (2,3 mmoles) de HTBPM éster de bencilo, sal de bencetonio obtenida según el ejemplo 4 (esterificada al 96%) con un contenido en agua de 0,23%, en un matraz de tres bocas de 50 ml con 30 ml de diclorometano seco. La mezcla se lleva a 30°C. Se añaden 595 µl (2,3 mmoles) de terc-Butilimino-tris(dimetilamino) fosforano y se agita 24 h a 30°C.

. Transformación de la sal de amonio cuaternario en sal de sodio (etapa e) del procedimiento)

5 Durante este tiempo, se preparan 160 ml de una disolución metanólica de acetato de sodio al 10% en un erlenmeyer de 250 ml. La mezcla de reacción se vierte en la disolución metanólica manteniendo la temperatura a aproximadamente 4°C. La suspensión se agita aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Se deja sedimentar durante 10 aproximadamente 1 h. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (120 ml). Se agita aproximadamente 30 minutos y se deja sedimentar 30 minutos. El sobrenadante se desecha de nuevo y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (125 ml). Se agita durante aproximadamente 15 minutos y se filtra. La torta se lava 3 veces con 40 ml de metanol, se filtra con succión y se seca aproximadamente 18 h a una temperatura cercana a 50°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 982 mg de HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio. El rendimiento obtenido es 65%.

. Saponificación de la HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio (etapa f1 del procedimiento):

15 Se solubilizan 980 mg (1,49 mmoles) de HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio en 10 ml de agua. La disolución se carga en un matraz de tres bocas de 100 ml. Se introducen 246 µl (2,45 mmoles) de polvo de sosa al 30% a una temperatura cercana a 4 °C. Se agita durante aproximadamente 2 h a esta temperatura. La disolución se neutraliza por 20 adición de ácido acético glacial (100%). Se añaden 4,9 g de acetato de sodio sólido y 95 ml de metanol. La suspensión se agita 30 minutos y se deja sedimentar durante aproximadamente 1 hora. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (60 ml). Se agita aproximadamente 30 minutos y se deja sedimentar aproximadamente 16 horas. El sobrenadante se desecha y se reemplaza por la misma cantidad de metanol (60 ml). Se agita durante aproximadamente 30 minutos y se filtra sobre membrana de 0,45 µm. La torta se lava 2 veces con 10 ml de metanol, se filtra con succión y se seca aproximadamente 18 h a 50°C bajo presión reducida (6 kPa). Se obtienen 809 mg de HTBPM despolimerizada bruta, sal de sodio.

El rendimiento de la reacción es 91,6%.

. Purificación de la HTBPM despolimerizada bruta -sal de sodio - etapa f2 del procedimiento:

25 Se cargan 792 mg de HTBPM despolimerizada bruta (sal de sodio) en un matraz de tres bocas de 25 ml con 8 ml de agua. La disolución se lleva 10 minutos a 40°C. El pH se lleva a aproximadamente 9,5 por adición de sosa 0,1 N. La disolución se filtra sobre membrana 0,45 µm y se añaden 39,6 µl de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. La mezcla se agita 2 h a temperatura ambiente manteniendo el pH constante a $9,5 \pm 0,1$ por adición de sosa 0,1 N. La mezcla de reacción se neutraliza con HCl 1 N y se añaden 1,04 g de NaCl. Después de aproximadamente 10 minutos de agitación, la disolución se filtra sobre membrana 0,45 µm. Se vierten 7,3 ml de metanol a una temperatura 30 cercana a 4 °C. La disolución se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 18,8 ml de metanol y la suspensión se agita durante aproximadamente 1 h. La agitación se para y se filtra. La torta se lava con 3 partes de 15 ml de metanol. El sólido húmedo se filtra con succión y se seca bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura cercana a 50°C. Después de 18 horas de secado, se obtienen 538 mg de HTBPM despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es 67,9%.

35 Característica de la HTBPM despolimerizada así obtenida

Peso molecular medio: 2.100 Daltons

Índice de polidispersidad: 1,1

Actividad anti-Xa: 209 UI/mg

Ejemplo 6:

40 HTBPM obtenida por el procedimiento según la invención que comprende una etapa adicional de separación por cromatografía eliminando las fracciones disacáridas y tetrasacáridas

La mezcla de oligosacáridos descrita en el ejemplo 1 (286 mg) se solubiliza en 20 ml de fase móvil (disolución acuosa de bicarbonato de sodio a 0,2 moles /l). Las condiciones cromatográficas son las siguientes:

- Fase móvil: disolución de bicarbonato de sodio a 0,2 moles/ l
- 45 – Fase estacionaria: Gel biogel P6
- Columna: Longitud 1 m, Diámetro 5 cm.
- Longitud de onda de detección: 240 nm.

50 Las fracciones superiores o iguales a un hexasacárido se recogen y se reúnen. Se neutralizan con ácido acético y se concentran hasta la obtención de una disolución a 200 g/ l de acetato de sodio. A la disolución obtenida y con agitación, se añaden 5 volúmenes de metanol. La suspensión se agita durante aproximadamente 18h y se filtra sobre membrana 0,45 µm. La torta se seca durante aproximadamente 6 h a una temperatura cercana a 40°C bajo presión reducida

(6kPa). El producto obtenido se vuelve a precipitar, se disuelve en un mínimo de agua y se desala en columna Sephadex G10. Después de concentrar las fracciones desaladas y de liofilizar, se obtienen 109 mg de producto. El rendimiento es 38%.

Las características de la mezcla de oligosacáridos así obtenida son las siguientes:

5 Actividad anti-Xa: 403 UI/mg

El porcentaje de los oligosacáridos es el siguiente:

| Pm | Poli | Di | Tetra | Hexa | Octa | Deca | > Deca |
|-------|-------------|----|-------|-------|-------|------|--------|
| (Da) | dispersidad | % | % | % | % | % | % |
| 2.150 | 1,0 | 0 | 0 | 53,83 | 32,58 | 10,5 | 3,5 |

Actividad farmacológica de los compuestos según la invención:

| Ejemplos | Peso molecular medio | Actividad Anti Xa | Actividad Anti IIa |
|----------|----------------------|-------------------|--------------------|
| | | UI/mg | |
| 1 | 1.950 | 283 | < 0,2 |
| 2 | 2.100 | 191 | 0 |
| 3 | 2.000 | 252 | 0 |
| 4 | 2.000 | 205 | 0 |
| 5 | 2.100 | 209 | 0 |
| 6 | 2.150 | 403 | 0 |

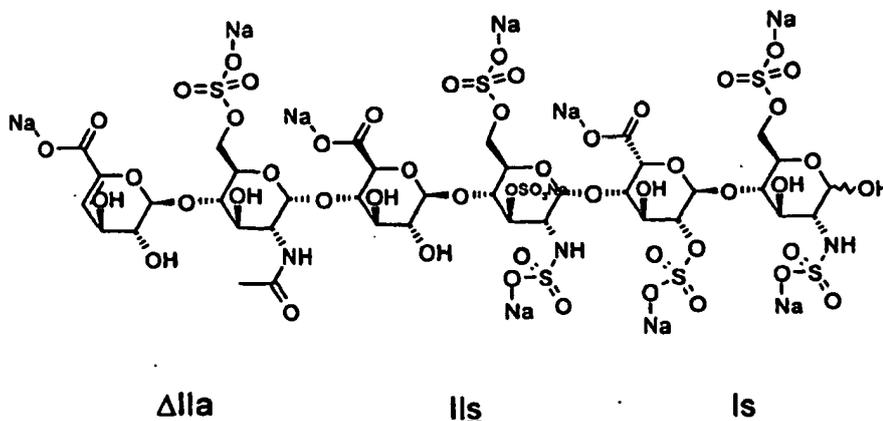
10 Porcentaje en hexasacárido Δ IIa-II \underline{s} -Is de los compuestos según la invención:

| Ejemplos | Porcentaje de fracción hexasacárida | Porcentaje de hexasacárido Δ IIa-II \underline{s} -Is en la fracción hexasacárida |
|----------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 31% | 46% |
| 2 | 30% | 26% |
| 3 | 33% | 33,5% |
| 4 | 32% | 30,8% |
| 5 | 31,5% | 28,7% |
| 6 | 53,8% | 46% |

REIVINDICACIONES

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

- 5
- un peso molecular medio de 1.800 a 2.400 Daltons, determinado por cromatografía líquida de alta presión utilizando dos columnas en serie,
 - una actividad anti-Xa comprendida entre 190 UI/mg y 450 UI/mg, medida respecto a una heparina de muy bajo peso molecular estándar que titula de 140 a 180 U/mg,
 - una actividad anti-IIa inferior a 0,2 UI/mg, medida por el método amidolítico sobre un sustrato cromogénico según el método descrito en la monografía de las heparinas de baja masa molecular de la farmacopea europea,
- 10
- entendiéndose que los oligosacáridos que constituyen las mezclas
 - contienen de 2 a 16 restos sacarídicos,
 - tienen un resto ácido urónico-4,5 insaturado 2-O-sulfato en uno de sus extremos,
 - y contienen el hexasacárido de fórmula siguiente:



15 en forma de una sal de metal alcalino o alcalinotérreo.

2. Mezclas de oligosacáridos según la reivindicación 1 **caracterizadas porque** las sales de metal alcalino o alcalinotérreo son las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio.

3. Mezclas de oligosacáridos según la reivindicación 1 ó 2 **caracterizadas porque** contienen de 20 a 100%, y en particular de 30 a 60%, de fracción hexasacárida.

20 4. Mezclas de oligosacáridos según la reivindicación 3 **caracterizadas porque** la fracción hexasacárida contiene de 20 a 70%, y en particular de 25 a 50%, del hexasacárido Δ IIa-IIS-IS tal como se ha definido en la reivindicación 1.

5. Mezclas de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizadas porque** tienen un peso molecular medio comprendido entre 1.900 y 2.200 y en particular de 1.950 a 2.150 Daltons.

25 6. Mezclas de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizadas porque** tienen una actividad anti-Xa comprendida entre 190 UI/mg y 410 UI/mg, y en particular entre 200 y 300 UI/mg, presentando una actividad anti-IIa inferior a 0,2 UI/mg.

7. Mezclas de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizadas porque** presentan las características siguientes:

- 30
- un peso molecular medio comprendido entre 1.950 y 2.150 Daltons,
 - una actividad anti-Xa comprendida entre 190 UI/mg y 410 UI/mg y una actividad anti-IIa inferior a 0,2 UI/mg,
 - contienen de 30 a 60% de fracción hexasacárida que contiene de 25 a 55% de fracción Δ IIa-IIS-IS.

8. Procedimiento de preparación de las mezclas de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado porque** una heparina de muy bajo peso molecular que tiene:

una actividad anti-Xa superior a 140 UI/mg, medida respecto a una heparina de muy bajo peso molecular estándar que titula de 140 a 180 U/mg,

una actividad anti-IIa inferior a 5 UI/mg, medida por el método amidolítico sobre un sustrato cromogénico según el método descrito en la monografía de las heparinas de baja masa molecular de la farmacopea europea, y

5 una masa molecular media comprendida entre 2.000 y 3.000 Daltons, determinada por cromatografía líquida de alta presión utilizando dos columnas en serie,

se somete a las reacciones químicas siguientes:

a) Transalifación por acción de cloruro de bencetonio para obtener el heparinato de bencetonio,

10 b) Esterificación del heparinato de bencetonio obtenido por acción de cloruro de bencilo, y tratamiento con una disolución alcohólica de acetato de sodio para obtener la sal de sodio del éster bencilico de la heparina de muy bajo peso molecular

c) Transalifación del éster bencilico obtenido y obtención de la sal de amonio cuaternario,

d) Despolimerización mediante una base orgánica fuerte con pka preferentemente superior a 20 con el fin de obtener una heparina de muy bajo peso molecular despolimerizada,

15 e) Transformación de la sal de amonio cuaternario de la heparina de muy bajo peso molecular despolimerizada en sal de sodio

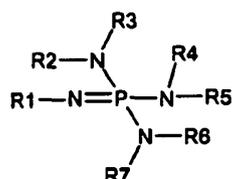
f) Saponificación de los ésteres residuales y opcionalmente purificación.

9. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8 **caracterizado porque** la relación en mol base fuerte/éster utilizada durante la etapa de polimerización d) está comprendida entre 0,2 y 5 y, preferentemente, entre 0,6 y 2.

20 10. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8 ó 9 **caracterizado porque** la etapa de despolimerización d) se efectúa utilizando como base un derivado del fosfaceno.

11. Procedimiento de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 **caracterizado porque** la etapa de despolimerización d) se efectúa con contenidos en agua inferiores a 0,3% cuando se opera con 1 equivalente molar de base fosfaceno respecto al éster bencilico de la heparina de muy bajo peso molecular, sal de bencetonio.

25 12. Procedimiento de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 **caracterizado porque** las bases de la familia de los fosfacenos utilizadas durante la etapa de despolimerización d) son, preferentemente, las de fórmula:



30 en la que los radicales R₁ a R₇, idénticos o diferentes, representan radicales alquilo lineales, ramificados o cíclicos que contienen de 1 a 6 átomos de carbono pudiendo formar R₃ y R₄, llegado el caso, con el grupo al que están unidos -N-P-N- un heterociclo de 6 eslabones.

13. Procedimiento de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 **caracterizado porque** la base de la familia de los fosfacenos utilizada durante la etapa de despolimerización es 2-terc-butylimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diaza-fosforina.

35 14. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8 **caracterizado porque** la tasa de esterificación de la sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina durante la etapa b) está comprendida entre 40 y 100% y, preferentemente, entre 70 y 90%.

40 15. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8 **caracterizado porque** la transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina de muy bajo peso molecular tal como se ha preparado según la etapa b) del procedimiento según la reivindicación 8 en sal de sodio se efectúa por tratamiento del medio de reacción con una disolución alcohólica de acetato de sodio al 10% de acetato de sodio en metanol (peso/volumen), a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C.

16. Procedimiento de preparación según la reivindicación 15 **caracterizado porque** el equivalente en peso de acetato de sodio añadido durante la etapa de esterificación b) es 3 veces superior a la masa de sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina aplicada en la reacción de despolimerización.

17. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8 de las mezclas de oligosacáridos **caracterizado porque** la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina de muy bajo peso molecular obtenida durante la etapa c) es preferentemente la sal de bencetonio, de cetilpiridinio o de cetiltrimetil amonio.
- 5 18. Procedimiento de preparación según la reivindicación 8 **caracterizado porque** la saponificación (según la etapa f) se efectúa mediante un hidróxido de metal alcalino tal como sosa, potasa, hidróxido de litio, en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre 0 y 20°C y preferentemente 0 y 10°C.
19. Procedimiento de preparación según la reivindicación 18 **caracterizado porque** se utiliza de 1 a 5 equivalentes molares del hidróxido de metal alcalino y más particularmente de 1 a 2 equivalentes molares del hidróxido de metal alcalino.
- 10 20. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 19, de preparación de mezclas de oligosacáridos tales como se han descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que poseen una selectividad frente al factor Xa aumentada **caracterizado porque** además se eliminan las fracciones disacáridas y tetrasacáridas por cromatografía principalmente en columnas rellenas con gel de tipo poliacrilamida agarosa.
- 15 21. Procedimiento de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 20 de las mezclas de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado porque** se utiliza como producto de partida una heparina de bajo peso molecular, o una heparina de muy bajo peso molecular (1.500 a 3.000 Da) que tiene una actividad anti-Xa comprendida entre 100 y 140 UI/mg en lugar de la heparina de muy bajo peso molecular tal como se ha definido en la reivindicación 8.
- 20 22. Procedimiento de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 20 de las mezclas de oligosacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado porque** se utiliza a título de producto de partida una heparina de muy bajo peso molecular (1.500 a 4.000 Da) que tiene una actividad anti-Xa comprendida entre 100 y 140 UI/mg en lugar de la heparina de muy bajo peso molecular tal como se ha definido en la reivindicación 8.
- 25 23. Procedimiento de preparación según la reivindicación 21 **caracterizado porque** la heparina de bajo peso molecular se elige entre Enoxaparina, Fraxiparina, Fragmina, Innohep (o Logiparina), Normiflo, Embollex (o Sandoparina), Fluxum (o Minidaltón), Clivarina e Hibor.
24. Medicamento, **caracterizado porque** comprende una mezcla de oligosacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 25. Medicamento según la reivindicación 24 para el tratamiento o la prevención de trombosis venosas y arteriales, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, angina inestable, infarto de miocardio, isquemia cardíaca, enfermedades oclusivas de las arterias periféricas y fibrilación auricular, proliferación de las células musculares lisas aterosclerosis y arteriosclerosis, cáncer por la modulación de la angiogénesis y los factores de crecimiento, así como trastornos diabéticos tales como retinopatías y nefropatías diabéticas.
- 35 26. Composición farmacéutica que contiene al menos un medicamento tal como se ha definido en la reivindicación 24 y uno o varios excipientes o vehículos o aditivos farmacéuticamente inertes.
27. Composición farmacéutica según la reivindicación 26 **caracterizada porque** consiste en una disolución inyectable por vía subcutánea o intravenosa.
28. Composición farmacéutica según la reivindicación 26 **caracterizada porque** consiste en una formulación por inhalación destinada a la vía pulmonar.
- 40 29. Composición farmacéutica según la reivindicación 26 **caracterizada porque** consiste en una formulación destinada a la vía oral.