



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **89356** (13) **C2**  
(51) **МПК**  
**C08B 37/10 (2006.01)**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) СУМІШ ОЛІГОСАХАРИДІВ, ЯКІ Є ПОХІДНИМИ ГЕПАРИНУ, СПОСІБ ЇЇ ОДЕРЖАННЯ І ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА ЇХ МІСТИТЬ**

1

2

(21) a200601969

(22) 22.07.2004

(24) 25.01.2010

(86) PCT/FR2004/001943, 22.07.2004

(31) 0309041

(32) 24.07.2003

(33) FR

(46) 25.01.2010, Бюл.№ 2, 2010 р.

(72) ЛАУКС ФОЛЬКЕР, DE, МУРЬЄ ПЬЄР, FR, ВІСКОВ КРИСТІАН, FR

(73) АВЕНТІС ФАРМА С.А., FR

(56) EP 0 027 089 A

WO 02/08295 A

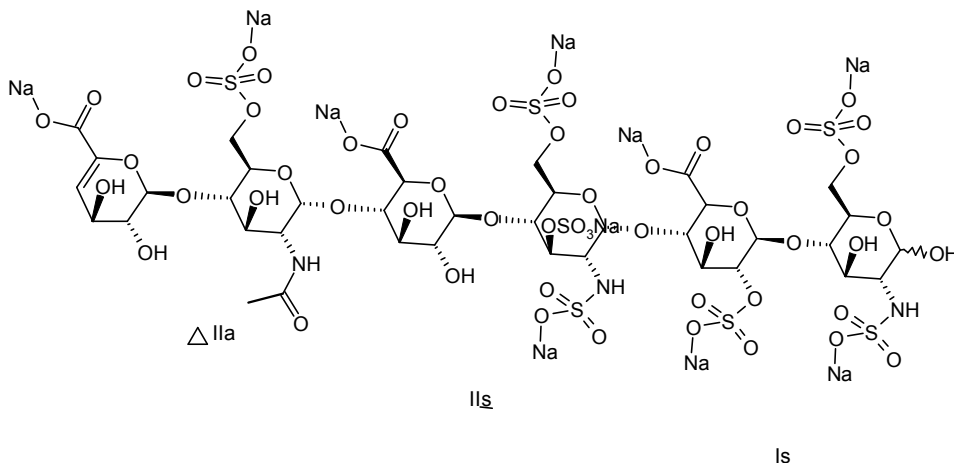
US 6 384 021 B1

WO 01/72762 A

WO 2004/033503 A

**(57)** 1. Суміш олігосахаридів, що мають загальну структуру конститутивних полісахаридів гепарину і мають наступні характеристики:

- середня молекулярна маса від 1800 до 2400 Да,
- активність анти-Ха, від 190 М.од./мг до 450 М.од./мг,
- активність анти-IIa становить менше 0,2 М.од./мг; причому конститутивні олігосахариди цих сумішей:
- містять 2-16 сахаридних ланок,
- мають ланку 2-О-сульфат-4,5-ненасиченої урнкової кислоти на одному з їх кінців,
- і містять гексасахарид наступної формули:



в формі солі лужного або лужноземельного металу.

2. Суміш олігосахаридів за п. 1, яка **відрізняється** тим, що солями лужного або лужноземельного металу є солі натрію, калію, кальцію і магнію.

3. Суміш олігосахаридів за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що вона містить 20-100 %, зокрема 30-60 %, гексасахаридної фракції.

4. Суміш олігосахаридів за п. 3, яка **відрізняється** тим, що гексасахаридна фракція містить 20-70 %, зокрема 25-50 %, гексасахариду  $\Delta$  IIa - IIb - Is, який описаний в п. 1.

5. Суміш олігосахаридів за будь-яким з пп. 1-4, яка **відрізняється** тим, що вона має середню молекулярну масу 1900-2200, зокрема 1950-2150 Да.

6. Суміш олігосахаридів за будь-яким з пп. 1-5, яка **відрізняється** тим, що вона має активність анти-Ха, яка дорівнює 190-410 М.од./мг, зокрема, яка дорівнює 200-300 М.од./мг, і активність анти-IIa менше 0,2 М.од./мг.

7. Суміш олігосахаридів за будь-яким з пп. 1-6, яка **відрізняється** тим, що вона має наступні характеристики:

- середню молекулярну масу 1950-2150 Да,
- активність анти-Ха, яка дорівнює 190-410 М.од./мг і активність анти-IIa менше 0,2 М.од./мг,

**C2**  
(13)

**89356**  
(11)

**UA**  
(19)

- включає 30-60 % гексасахаридної фракції, яка містить 25-55 % фракції  $\Delta$  IIa -II<sub>s</sub> -Is.

8. Спосіб одержання суміші олігосахаридів за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що гепарин дуже низької молекулярної маси, що має активність анти-Ха вище 140 М.од./мг, активність анти-IIa нижче 5 М.од./мг і середню молекулярну масу 2000-3000 Да, піддають наступним хімічним реакціям:

а) перетворенню однієї солі в іншу при дії хлориду бензетонію для одержання гепаринату бензетонію, б) етерифікації одержаного гепаринату бензетонію під дією бензилхлориду і обробці для одержання солі натрію складного бензилового ефіру гепарину дуже низької молекулярної маси,

с) перетворенню солі одержаного складного бензилового ефіру і одержанню солі четвертинного амонію,

д) деполімеризації за допомогою сильної органічної основи з рка, переважно, вище 20 з одержанням деполімеризованого гепарину дуже низької молекулярної маси,

е) перетворенню солі четвертинного амонію деполімеризованого гепарину дуже низької молекулярної маси в сіль натрію,

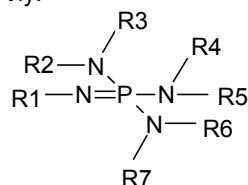
ф) омиленню складноефірних залишків і, можливо, очищенню.

9. Спосіб одержання за п. 8, який **відрізняється** тим, що молярне співвідношення сильна основа/складний ефір, що використовують на стадії деполімеризації d), становить 0,2-5, переважно 0,6-2.

10. Спосіб одержання за п. 8 або 9, який **відрізняється** тим, що стадію деполімеризації d) здійснюють з використанням похідного фосфазену як основи.

11. Спосіб одержання за будь-яким з пп. 8-10, який **відрізняється** тим, що стадію деполімеризації d) здійснюють при вмісті води нижче 0,3 %, якщо використовують 1 молярний еквівалент фосфазенової основи по відношенню до солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВТМ.

12. Спосіб одержання за будь-яким з пп. 8-11, який **відрізняється** тим, що основи, які належать до сімейства фосфазенів, що використовують на стадії деполімеризації d), мають, переважно, формулу:



в якій радикали R1-R7, однакові або різні, означають алкільні лінійні, розгалужені або циклічні радикали, що містять 1-6 атомів вуглецю, при цьому R3 і R4 можуть, при бажанні, утворювати з групою -N-P-N-, з якою вони зв'язані, 6-членний гетероцикл.

13. Спосіб одержання за будь-яким з пп. 8-12, який **відрізняється** тим, що основа, яка належить до сімейства фосфазенів, що використовують на стадії деполімеризації, являє собою 2-

трет.бутиліміно-2-діетиламіно-1,3-диметилпергидро-1,3,2-діазафосфорин.

14. Спосіб одержання за п. 8, який **відрізняється** тим, що ступінь етерифікації солі четвертинного амонію складного бензилового ефіру гепарину на стадії b) становить 40-100 %, переважно 70-90 %.

15. Спосіб одержання за п. 8, який **відрізняється** тим, що перетворення солі четвертинного амонію складного ефіру гепарину дуже низької молекулярної маси, одержаного на стадії b) способу за п. 8, в сіль натрію здійснюють шляхом обробки реакційного середовища спиртовим розчином ацетату натрію, переважно 10 % розчином ацетату натрію в метанолі (маса/об'єм), при температурі 15-25 °С.

16. Спосіб одержання за п. 15, який **відрізняється** тим, що масовий еквівалент ацетату натрію, що вводять на стадії етерифікації b), складає трикратну кількість маси солі четвертинного амонію складного бензилового ефіру гепарину, що вводять в реакцію деполімеризації.

17. Спосіб за п. 8 одержання суміші олігосахаридів, який **відрізняється** тим, що сіль четвертинного амонію складного бензилового ефіру гепарину дуже низької молекулярної маси, одержаного на стадії c), переважно, являє собою сіль бензетонію, цетилпіридинію або цетилтриметиламонію.

18. Спосіб одержання за п. 8, який **відрізняється** тим, що омилення на стадії f) здійснюють за допомогою гідроксиду лужного металу, такого як гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид літію, у водному середовищі при температурі 0-20 °С, переважно 0-10 °С.

19. Спосіб одержання за п. 18, який **відрізняється** тим, що використовують 1-5 молярних еквівалентів гідроксиду лужного металу, більш конкретно 1-2 молярних еквіваленти гідроксиду лужного металу.

20. Спосіб за будь-яким з пп. 8-19 одержання суміші олігосахаридів, описаних в будь-якому з пп. 1-5, що мають підвищену селективність відносно фактора Ха сумішей олігосахаридів, який **відрізняється** тим, що додатково здійснюють видалення дисахаридних і тетрасахаридних фракцій шляхом хроматографії, зокрема, на колонках, наповнених гелем агар-поліакриламідного типу.

21. Спосіб одержання суміші олігосахаридів, вказаних в будь-якому з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що гепарин низької молекулярної маси або гепарин дуже низької молекулярної маси (1500-3000 Да), що мають активність анти-Ха 100-140 М.од./мг, піддають наступним хімічним реакціям:

а) перетворенню однієї солі в іншу при дії хлориду бензетонію для одержання гепаринату бензетонію, б) етерифікації одержаного гепаринату бензетонію під дією бензилхлориду і обробці для одержання солі натрію складного бензилового ефіру гепарину дуже низької молекулярної маси,

с) перетворенню солі одержаного складного бензилового ефіру і одержанню солі четвертинного амонію,

д) деполімеризації за допомогою сильної органічної основи з рка, переважно вище 20, з одержанням деполімеризованого гепарину дуже низької молекулярної маси,

е) перетворенню солі четвертинного амонію деполімеризованого гепарину дуже низької молекулярної маси в сіль натрію,

ф) омиленню складноефірних залишків і, можливо, очищенню.

22. Спосіб одержання суміші олігосахаридів, вказаних в будь-якому з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що гепарин дуже низької молекулярної маси (1500-4000 Да), що має активність анти-Ха 100-140 М.од./мг, піддають наступним хімічним реакціям:

а) перетворенню однієї солі в іншу при дії хлориду бензетонію для одержання гепаринату бензетонію, б) етерифікації одержаного гепаринату бензетонію під дією бензилхлориду і обробці для одержання солі натрію складного бензилового ефіру гепарину дуже низької молекулярної маси,

с) перетворенню солі одержаного складного бензилового ефіру і одержанню солі четвертинного амонію,

д) деполімеризації за допомогою сильної органічної основи з рКа, переважно вище 20, з одержанням деполімеризованого гепарину дуже низької молекулярної маси,

е) перетворенню солі четвертинного амонію деполімеризованого гепарину дуже низької молекулярної маси в сіль натрію,

ф) омиленню складноефірних залишків і, можливо, очищенню.

23. Спосіб одержання за п. 21, який **відрізняється** тим, що гепарин низької молекулярної маси вибирають з Еноксапарину, Фраксипарину, Фрагміну, Інохепу (або Логіпарину), Норміфлу, Емболексу

(або Сандопарину), Флюксуму (або Мінідальтону), Кліварину і Хібору.

24. Суміш олігосахаридів, вказана в будь-якому з пп. 1-7, як лікарський засіб.

25. Суміш олігосахаридів, вказана в будь-якому з пп. 1-7, як лікарський засіб, що має антитромботичну активність.

26. Суміш олігосахаридів за п. 24 або 25 для лікування або профілактики венозних або артеріальних тромбозів, глибокого венозного тромбозу, емболії легень, нестабільної стенокардії, інфаркту міокарда, ішемічної хвороби серця, оклюзивних захворювань периферичних артерій і миготливої аритмії, проліферації клітин гладкої мускулатури, атеросклерозу і артеріосклерозу, лікування і профілактики раку шляхом модулювання ангиогенезу і факторів росту, а також для лікування і профілактики порушень діабетичного походження, таких як діабетичні ретинопатії і нефропатії.

27. Фармацевтична композиція, яка містить щонайменше один лікарський засіб, описаний в п. 24, і один або декілька фармацевтично інертних ексципієнтів або носіїв, або добавок.

28. Фармацевтична композиція за п. 27, яка **відрізняється** тим, що вона являє собою розчин для ін'єкцій, що вводиться підшкірним шляхом або внутрішньовенно.

29. Фармацевтична композиція за п. 27, яка **відрізняється** тим, що вона являє собою склад для інгаляції, призначений для введення через легені.

30. Фармацевтична композиція за п. 27, яка **відрізняється** тим, що вона являє собою склад, призначений для перорального введення.

Даний винахід стосується сумішей олігосахаридів, які є похідними гепарину, що мають середню молекулярну масу від 1800 до 2400 Дальтон, відмінних високою активністю анти-Ха (аХа) і відсутністю активності анти-IIa (alla), способу їх отримання і до фармацевтичних композицій, що їх містять.

Гепарин являє собою суміш сульфатвмісних мукополісахаридів тваринного походження і використовується, зокрема, завдяки своїм антикоагулюючим і антитромботичним властивостям.

Однак гепарин має недоліки, які обмежують умови його застосування. Зокрема, його висока антикоагулююча активність (alla) може бути причиною кровотеч. (Seminars in Thrombosis and Hemostasis, vol.5 sup.3 (1999)).

Низькомолекулярні гепарини, отримані, зокрема, лужною деполімеризацією складного ефіру гепарину і що випускаються в цей час під найменуванням Еноксапарин, також мають високу активність alla.

У більш пізніх публікаціях рівня техніки описані гепарини з дуже низькою молекулярною масою. Наприклад, в патенті США 6384021 описані продукти, що мають активність анти-Ха в інтервалі від 100 до 120М.од./мг і активність анти-IIa в інтервалі

від 2 до 8М.од./мг. У міжнародних заявках W002/08295 і W02004/033503 описані продукти, що мають активність анти-Ха, яка дорівнює, зокрема, 100-190М.од./мг при активності анти-IIa нижче за 5М.од./мг. Однак, жоден з вказаних гепаринів з дуже низькою молекулярною масою фактично не володіє активністю анти-Ха вищою за 190М.од./мг і нульовою або практично нульовою активністю анти-IIa. (UI - міжнародна одиниця).

Під практично нульовою активністю анти-IIa (або іншими словами, що практично не володіють активністю анти-IIa) розуміють активність нижчу за 0,2М.од./мг.

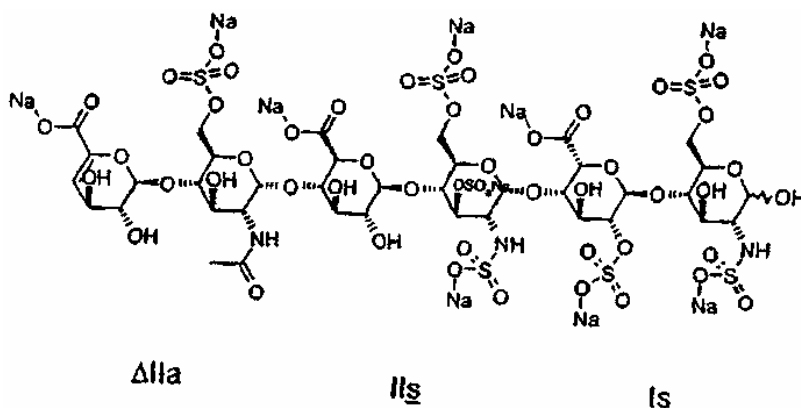
Винахід стосується сумішей олігосахаридів, які мають дуже високу селективну активність відносно активованого фактора Х (фактора Ха) і при цьому що не володіє або практично що не володіє активністю анти-IIa.

Таким чином, винахід стосується сумішей олігосахаридів, що мають загальну формулу конститутивних полісахаридів гепарину і що володіють наступними характеристиками:

- вони мають середню молекулярну масу від 1800 до 2400 Дальтон, активність анти-Ха, яка дорівнює 190-450М.од./мг і не мають, або практично не мають активності анти-IIa;

- при цьому конститутивні олігосахариди сумішей:
- містять 2-16 сахаридних ланок,

- мають ланку 2-О-сульфат-4,5-ненасиченої уронової кислоти на одному з її кінців,
- і містять гексасахарид наступної формули:



в формі солі лужного або лужноземельного металу.

Гексасахарид  $\Delta IIa$ - $IIs$ - $Is$ , що міститься в суміші олігосахаридів, яка описується в даному винаході, є послідовністю, що володіє сильною спорідненістю з АТІІІ і активністю, що характеризується аХа вище за 740М.од./мг.

Як сіль лужного або лужноземельного металу переважні солі натрію, калію, кальцію і магнію.

Середню молекулярну масу визначають методом рідинної хроматографії під високим тиском з використанням двох послідовно встановлених колонок, наприклад, колонок, що випускаються в продаж під найменуваннями TSK G3000 XL і TSK G2000 XL. Визначення проводять методом рефрактометрії. Елюентом, що використовується, є нітрат літію і елюційна витрата становить 0,6мл/хв. Систему відкалібровують за допомогою стандартів, отриманих шляхом фракціонування Еноксапарину методом хроматографії на агар-поліакриламідному гелі (IBF). Цей метод отримання здійснюють відповідно до методики, описаної Barrowcliffe et al, *Thromb.Res.*, 12, 27-36 (1977-78) або D.A.Lane et al, *Tromb.Res.*, 12, 257-271 (1977-78). Результати обробляють за допомогою програмного забезпечення GPC6 (Perkin Elmer). Активність анти-Ха вимірюють амідолітичним методом на хромогенному субстраті згідно з принципом, описаним Tein et al, *Thromb.Res.*, 10, 399-410 (1977). Кількісний аналіз був здійснений методом, описаним в монографії по низькомолекулярних гепаринах діючої фармацевтичної фармакопеї, за винятком відновлювального буфера: альбумін в буфері Tris-NaCl з рН 7,4 був замінений на поліетиленгліколь 6000 (ПЕГ 6000).

Вимірювання активності анти-Ха здійснювалося відносно стандартного гепарину дуже низької молекулярної маси (НТВРМ) з концентрацією 140-180 У/мг (на суху вагу). Активність стандартного НТВРМ вимірювалася по відношенню до міжнародного стандартного еталону низькомолекулярного гепарину.

Цей стандартний НТВРМ був отриманий відповідно до відомостей, які є в міжнародних заявках на патент W002/08295, зокрема в заявці WO

2004/033503. Активність стандартного НТВРМ вимірювалася по відношенню до міжнародного стандартного еталону низькомолекулярного гепарину.

Активність анти-ІІа вимірювалася амідолітичним методом на хромогенному субстраті згідно з методом, описаним в монографії по низькомолекулярних гепаринах діючої фармацевтичної фармакопеї. Вимірювання активності  $\Delta IIa$  здійснювалося по відношенню до стандартного гепарину дуже низької молекулярної маси (НТВРМ) з вимірюваною активністю 2,1М.од./мг. Активність стандартного НТВРМ вимірювалася по відношенню до міжнародного стандартного еталону низькомолекулярного гепарину.

Згідно з переважним варіантом суміш олігосахаридів згідно з винаходом містить 20-100% гексасахаридної фракції. Зокрема, ця суміш містить 30-60% гексасахаридної фракції.

Крім того, суміші згідно з винаходом містять 20-70% гексасахариду  $\Delta IIa$ - $IIs$ - $Is$  в гексасахаридній фракції суміші олігосахаридів. Зокрема, ця фракція  $\Delta IIa$ - $IIs$ - $Is$  в гексасахаридній фракції становить 25-50%.

Процентний вміст гексасахаридної фракції може бути визначений методом аналізу з допомогою рідинної хроматографії при високому тиску на колонках TSK G3000 XL і TSK G2000 XL або методом препаративного розділення гексасахаридної фракції.

У цьому випадку хроматографію проводять на колонках, заповнених гелем агар-поліамідного типу. Суміш елюють розчином бікарбонату натрію. Переважно, розчин бікарбонату натрію являє собою розчин з концентрацією від 0,1мол/л до 1мол/л. Більш переважно, розділення здійснюють з концентрацією 1мол/л. Вимірювання здійснюють шляхом спектрометрії в УФ області (254нм). Після фракціонування гексасахаридну фракцію, розчинену в бікарбонаті натрію, нейтралізують крижаною оцтовою кислотою. Розчин потім концентрують під зниженим тиском так, щоб концентрацію ацетату натрію була вищою за 30% мас. Гексасахаридну фракцію осаджують додаванням 3-5 об'ємів метанолу. Гексасахаридну фракцію відділяють шляхом фільтрації через фритоване скло п°3.

Отриману суміш гексасахаридів аналізують високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) і визначають вміст гексасахариду  $\Delta$ IIa-III-Is. Гексасахарид  $\Delta$ IIa-III-Is можна виділити шляхом препаративної ВЕРХ або афінною хроматографією на колонці з антитромбін III-сефарозою згідно з методами, відомими фахівцеві (m.Hook / I.Bjork, J.Hopwood and U.Lindahl, F.E.B.S letters, vol.656(1) (1976)).

Переважно, суміші згідно з винаходом мають середню молекулярну масу від 1900 до 2200 Дальтон і, зокрема, від 1950 до 2150 Дальтон.

Згідно з переважним варіантом суміш олігосахаридів згідно з винаходом характеризується тим, що вона володіє активністю анти-Ха, яка дорівнює 190-410М.од./мг і активністю анти-Ia, яка дорівнює нулю або практично дорівнює нулю. Більш конкретно, активність анти-Ха складає величину від 200 до 300М.од.

Таким чином, більш конкретно, винахід стосується сумішей, що мають наступні характеристики:

- середня молекулярна маса складає від 1950 до 2150 Дальтон,
- активність анти-Ха дорівнює 190-410М.од./мг і активність анти-Ia дорівнює нулю або практично дорівнює нулю;
- вони включають 30-60% фракції гексасахаридів, які містять 25-55% фракції  $\Delta$ IIa-III-Is.

Активність сумішей олігосахаридів згідно з винаходом зумовлена особливим способом отримання, описаним нижче. Фахівцеві добре відомо, що фізико-хімічні характеристики полісахаридних сумішей, а також активність, витікаючи з цих характеристик, пов'язана зі способом їх отримання (J.Med.Chem. 33(6) 1639-2093 (1990)).

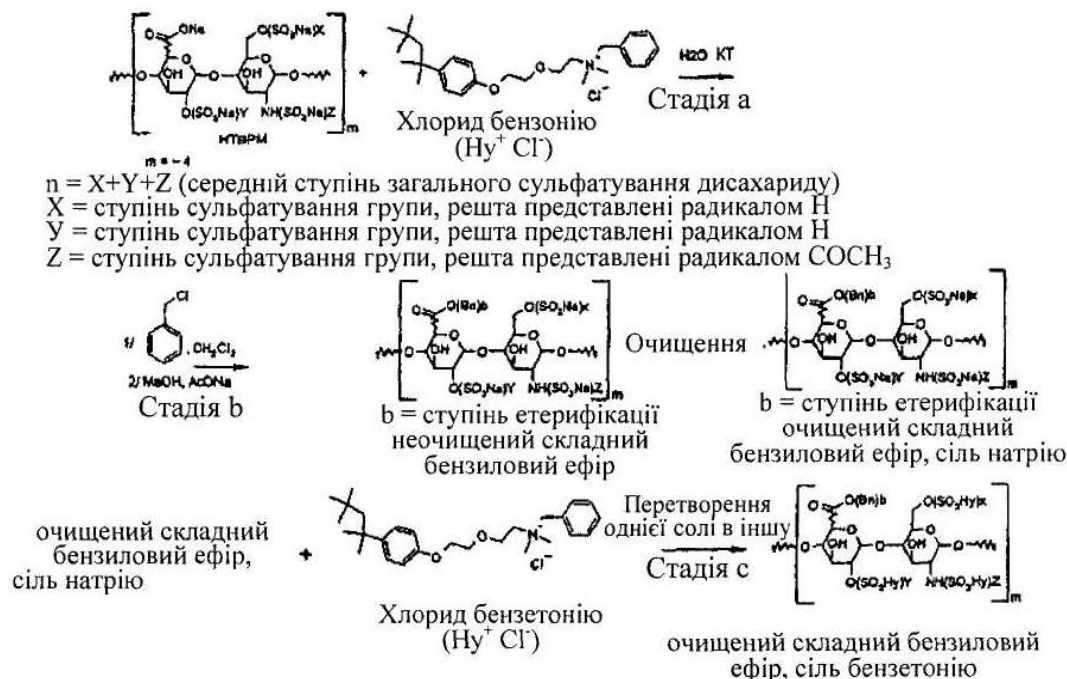
Суміші олігосахаридів згідно з винаходом отримують деполімеризацією четвертинної солі амонію складного бензилового ефіру гепарину дуже низької молекулярної маси (НТВРМ) в орга-

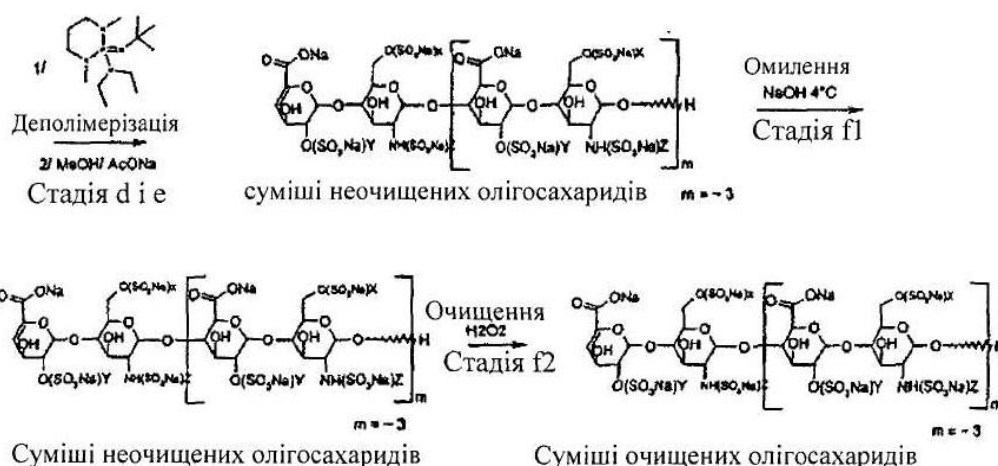
нічному середовищі, причому цей гепарин (НТВРМ) отриманий в свою чергу згідно з відомостями, розкритим в заявках на патент WO 02/08295 і WO 2004/033503. Загалом, мова йде про повторну деполімеризацію гепарину дуже низької молекулярної маси, який сам був отриманий специфічним чином шляхом деполімеризації етерифікованого гепарину в присутності сильної основи, переважно, в дихлорметані, і при вмісті води менше за 3%.

НТВРМ, що використовуються в даному винаході як сировинний продукт, були отримані, зокрема, згідно з способами, розкритими в заявках на патент WO 02/08295 і WO 2004/033503.

НТВРМ, що використовуються в даному винаході як вихідний продукт, володіють, зокрема, активністю аХа вищою 140М.од./мг, активністю аліа нижчою 5М.од./мг і мають середню молекулярну масу від 2000 до 3000 Дальтон. Вимірювання активності аХа здійснювалося відносно стандартного НТВРМ з вимірюною активністю 158М.од./мг. Активність стандартного НТВРМ вимірювалася відносно міжнародного стандартного еталону низькомолекулярного гепарину.

Вихідні НТВРМ, отримані згідно з способом, який описаний вище, повторно деполімеризують за допомогою сильної органічної основи з рка, переважно, вище 20 (з властивостями, переважно, близькими властивостям сімейства фосфазенів, описаних, наприклад, R.Schwesinger et al, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987) або R.Schwesinger et al, Angew. Chem. 105, 1420 (1993)). Потім перетворюють четвертинну амонієву сіль складного бензилового ефіру деполімеризованого НТВРМ в сіль натрію, омилують залишкові складноефірні функції і, можливо, очищують отриманий продукт. Наступна схема реакцій ілюструє даний винахід:





Винахід стосується таким чином способу отримання сумішей олігосахаридів, таких, які описані вище, який відрізняється тим, що гепарин дуже низької молекулярної маси, що має активність аХа вищу за 140М.од./мг, активність аlla нижчу за 5М.од./мг і середню молекулярну масу 2000-3000 Дальтон, піддають наступним хімічним реакціям:

а) перетворенню однієї солі в іншу при дії хлориду бензетонію для отримання гепаринату бензетонію,

б) етерифікації отриманого гепаринату бензетонію під дією бензилхлориду і обробці спиртовим розчином ацетату натрію для отримання солі натрію складного бензильового ефіру гепарину дуже низької молекулярної маси,

с) перетворенню солі отриманого складного бензильового ефіру і отриманню солі четвертинного амонію, переважно, солі бензетонію, солі цетилпіридинію або солі цетилтриметиламонію,

д) деполімеризації за допомогою сильної органічної основи з рка, переважно, вище за 20 для отримання деполімеризованого гепарину дуже низької молекулярної маси,

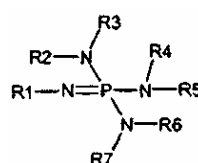
е) перетворенню солі четвертинного амонію деполімеризованого гепарину дуже низької молекулярної маси в сіль натрію,

ф) омиленню залишкових складноефірних функцій і, можливо, очищенню.

У даному винаході використовують, в більш конкретному випадку, високоселективну фосфазенову основу на стадії деполімеризації (стадія d), яка збагачує, несподіваним чином, суміш олігосахаридів послідовностями, що мають спорідненість з АТІІІ. Переважно, мольне співвідношення сильна основа/складний ефір становить 0,2-5, більш конкретно, 0,6-2.

Для досягнення оптимальної селективності і максимального збереження послідовностей, що має спорідненість з АТІІІ, переважно працюють при вмісті води нижче за 0,3%, якщо використовують 1 мольний еквівалент фосфазенової основи по відношенню до солі бензетонію складного бензильового ефіру НТВТМ.

Основи, що стосуються сімейства фосфазенів, переважно, являють собою основи формули:



в якій радикали  $R_1$ - $R_7$ , однакові або різні, означають алкільні лінійні, розгалужені або циклічні радикали, що містять 1-6 атомів вуглецю, при цьому  $R_3$  і  $R_4$  можуть, при бажанні, утворювати з групою  $-N-P-N-$ , з якою вони зв'язані, 6-ти членний гетероцикл. Зокрема, винахід стосується способу, описаного вище, який відрізняється тим, що основа, яка використовується на стадії деполімеризації d) являє собою 2-трет.бутиліміно-2-діетиламіно-1,3-диметилпергідро-1,3,2-діаза-фосфорин (по офіційній номенклатурі: 1,3,2-діазафосфорин-2-амін-2-[(1,1-диметилетил)іміно]-N,N-діетил-1,2,2,2,3,5,6-октагідро-1,3-диметил).

Реакцію на стадії а) перетворення однієї солі в іншу, переважно здійснюють шляхом впливу надлишку хлориду бензетонію на сіль натрію НТВРМ при температурі близько 15-25°C. Переважно, мольне співвідношення сіль/гепарин, сіль натрію, складає від 2,5 до 3,5.

Етерифікацію на стадії б) здійснюють, переважно, в середовищі хлорвмісного органічного розчинника (такого як хлороформ або дихлорметан) при температурі від 25 до 45°C, переважно, від 30 до 40°C. Складний ефір в формі солі натрію потім виділяють осадженням за допомогою 10% (по масі) розчину ацетату натрію в спирті, такому як метанол. Звичайно використовують 1-1,2 об'єми спирту на об'єм реакційного середовища. Кількість бензилхлориду і тривалість реакції вибирають такими, щоб досягнути ступеню етерифікації 40-100%, переважно, 70-90%. Переважно, використовують 0,5-1,5 мас. частин бензилхлориду на 1 мас. частину солі бензетонію гепарину. Виходячи з того ж, тривалість реакції переважно, становить 10-35 годин.

Отже, в способі згідно з винаходом досягають ступеню етерифікації солі четвертинного амонію складного бензильового ефіру гепарину, що дорівнює 40-100%, переважно, 70-90%.

Перетворення солі четвертинного амонію складного бензильового ефіру деполімеризованого

гепарину в натрієву сіль здійснюють, як правило, обробкою реакційного середовища спиртовим розчином ацетату натрію, переважно, 10%-им розчином ацетату натрію в метанолі (маса/об'єм) при температурі від 15 до 25°C.

Масовий еквівалент ацетату, що вводиться, переважно складає трикратну кількість маси солі четвертинного амонію складного бензилового ефіру гепарину, що вводиться надалі в реакцію деполімеризації. Сіллю четвертинного амонію отриманого складного бензилового ефіру НТВРМ є, переважно, сіль бензетонію, сіль цетилпіридинію або цетилметиламонію.

Перетворення однієї солі в іншу на стадії с) здійснюють за допомогою хлориду четвертинного амонію, переважно, хлориду бензетонію, хлориду цетилпіридинію або хлориду цетилтриметиламонію, у водному середовищі при температурі від 10 до 25°C. Переважно, мольне співвідношення хлорид четвертинного амонію/сіль натрію складного бензилового ефіру гепарину складає від 2,5 до 3,5.

Омилення здійснюють, як правило, за допомогою гідроксиду лужного металу, такого як гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид літію, у водному середовищі при температурі від 0 до 20°C, переважно, від 0 до 10°C. Звичайно використовують 1-5 мольних еквіваленти гідроксиду лужного металу. Переважно, омилення здійснюють в присутності 1-2 мольних еквіваленти гідроксиду лужного металу.

Кінцевий продукт можливо, при необхідності, очищений будь-яким відомим методом очищення деполімеризованих гепаринів (наприклад, EP 0037319B1). Переважно, очищають за допомогою перекису водню у водному середовищі при температурі 10-50°C. Переважно, цю операцію здійснюють при температурі 20-40°C.

Згідно з винаходом суміші в формі солі натрію можуть бути перетворені в суміші іншої солі лужного металу або лужноземельного металу. Перехід від однієї солі до іншої можливий при використанні методу, описаного в патенті Франції 7313580.

Даний винахід дозволяє, зокрема, значно збільшити вміст гексасахариду  $\Delta\text{IIa-IIIs-Is}$ . Якщо повторно деполімеризують низькомолекулярний гепарин способом, яким він отриманий, то добре відомо фахівцям, що активність анти Ха отриманого продукту значно знижується і доходить до нуля. У випадку, коли використовують способи, що дозволяють отримати Еноксапарин, Фраксипарин, Фрагмін, Іннохеп (або Логипарин), Норміфло, Емболекс (або Сандопарин), Флюксум (або Мінідальтон), Кліварин і Хибор, то можна спостерігати це явище, якщо повторно деполімеризують ці НВРМ способом їх отримання. Наслідком цього є низька селективність цих способів відносно збереження областей АТІІІ.

У даному винаході, якщо використовують як вихідний продукт НТВРМ, отриманий способом фосфазенової деполімеризації, то спостерігається якраз зворотне явище. Активність аХа суміші олігосахаридів збільшується і навіть перевищує активність гепарину, який був вихідним при отриманні НТВРМ. Таке явище можливо є наслідком значної селективності фосфазенових основ відносно збе-

реження послідовностей, що мають спорідненість з АТІІІ.

Ця особливість способу спостерігається також при аналізі середньої молекулярної маси сумішей отриманих олігосахаридів. Наприклад, якщо деполімеризують НТВРМ зі середньою молекулярною масою 2400 Дальтон, то отримують суміш олігосахаридів зі середньою молекулярною масою 2000 Да. Висновок робиться такий, що послідовності, які мають спорідненість з АТІІІ (гексасахариди і октасахариди), не зазнають впливу фосфазенової основи, але який приводить до деструкції і елімінування інших послідовностей, і, отже, до середньої молекулярної маси, яка наближається до середньої молекулярної маси компонента, що не піддається деполімеризації, тобто гексасахариду  $\Delta\text{IIa-IIIs-Is}$  (1834г/мол). Потрібно підкреслити, що на стадії деполімеризації гепарину фосфазеновою основою середня молекулярна маса змінюється від 15000 Да до 2400 Да.

Альтернативою способу згідно з винаходом, що дозволяє збільшити активність і селективність відносно фактора Ха, є спосіб, що використовує низькомолекулярні гепарини загалом. Наприклад, ними можуть бути, зокрема, Еноксапарин, Фраксипарин, Фрагмін, Іннохеп (або Логипарин), Норміфло, Емболекс (або Сандопарин), Флюксум (або Мінідальтон), Кліварин і Хибор. Мова може також йти про деякі гепарини з дуже низькою молекулярною масою, такі, як описані в документах US 6384021 (2000-4000 Да) або WO 02/08295 (1500-3000 Да), що володіють активністю анти-Ха нижчою за 140М.од./мг (зокрема, від 100 до 140М.од./мг).

Вказана особливість способу виражена в досягненні величин активності анти-Ха, несподіваних при середній молекулярній масі сумішей олігосахаридів (190М.од./мг < аХа < 450М.од./мг; 1800 Да < РМ < 2400 Да).

Згідно з конкретним варіантом винаходу селективність відносно фактора Ха сумішей олігосахаридів може бути ще більше збільшена шляхом видалення дисахаридних і тетрасахаридних фракцій (фракцій, не пов'язаних специфічно з АТІІІ). Суміш в цьому випадку хроматографують на колонах, заповнених гелем агар-поліакриламідного типу або поліакриламідним гелем. Суміш елюють розчином бікарбонату натрію. Переважно, розчин бікарбонату натрію являє собою розчин з концентрацією 0,1-1мол/л. Ще більш переважно, розділення здійснюють з концентрацією 1мол/л. Вимірювання проводять шляхом спектрометрії в УФ частини спектра (254nm). Після видалення дисахаридних і тетрасахаридних фракцій суміш олігосахаридів, розчинену в бікарбонаті натрію, нейтралізують крижаною оцтовою кислотою. Розчин потім концентрують під зниженим тиском так, щоб концентрація ацетату натрію була вищою за 20% мас. Суміш олігосахаридів осаджують доданням 3-5 об'ємів метанолу. Суміш олігосахаридів з високою спорідненістю виділяють фільтрацією. Якщо, необхідно, суміш можна очистити шляхом видалення солей на відповідній колонці. Приклад 6 ілюструє цей альтернативний метод і дозволяє отримати гепарини дуже низької молекулярної

маси, у яких активність анти-Ха перевищує 400М.од./мг.

Таким чином, винахід стосується також описаного вище способу отримання сумішей олігосахаридів, що володіють підвищеною селективністю відносно фактора Ха сумішей олігосахаридів, який відрізняється тим, що додатково здійснюють видалення дисахаридних і тетрасахаридних фракцій шляхом хроматографії, зокрема, на колонках, заповнених гелем агар-поліакриламідного типу.

Суміші згідно з винаходом можуть бути використані як лікарські засоби.

Суміші олігосахаридів згідно з винаходом можуть бути використані як антитромботичні агенти. Зокрема, вони придатні для лікування або профілактики венозних або артеріальних тромбозів, глибокого венозного тромбозу, емболії легень, нестабільної стенокардії, інфаркту міокарда, ішемічної хвороби серця, оклюзивних захворювань периферичних артерій і миготливої аритмії. Вони також придатні для профілактики і лікування проліферації клітин гладкої мускулатури, атеросклерозу і артеріосклерозу, для лікування і профілактики раку шляхом модулювання ангіогенезу і факторів росту і для лікування і профілактики порушень діабетичного походження, такого як діабетичні ретинопатії і нефропатії.

Даний винахід стосується також фармацевтичних композицій, що містять як активне начало суміш формули (I), можливо, в сполученні з одним або декількома інертними ексципієнтами.

Фармацевтичні композиції являють собою, наприклад, розчини для ін'єкцій, що вводяться підшкірним шляхом або внутрішньовенно. Інші фармацевтичні композиції згідно з винаходом знаходяться в формі для введення через легені (інгаляція) або для прийому всередину через рот.

Дозування може змінюватися в залежності від віку, ваги і стану здоров'я пацієнта. Для дорослих доза звичайно становить 20-100мг на день при внутрішньом'язовому або підшкірному введенні.

Наступні приклади ілюструють винахід:

Приготування 1: Отримання вихідного гепарину дуже низької молекулярної маси з активністю аХа, яка дорівнює 158,8М.од./мг.

Гепарин дуже низької молекулярної маси (НТВРМ), що використовується як вихідний продукт в прикладі 1, отримують згідно із заявкою на патент WO 2004/033503 виходячи з гепарину натрію, здійснюючи стадії від а) до f), описані вище, причому стадію деполімеризації здійснюють в присутності 2-трет.бутиліміно-2-діетиламіно-1,3-диметилпергідро-1,3,2-діаза-фосфорину і при процентному вмісті води нижче за 0,6%.

Характеристики отриманого гепарину дуже низької молекулярної маси:

Характеристики отриманого деполімеризованого гепарину наступні:

Середня молекулярна маса: 2400 Дальтон

Активність анти-Ха: 158,8М.од./мг

Активність анти-IIa: 3,1М.од./мг

Співвідношення активність анти-Ха/активність анти-IIa: 51

Приготування 2: Отримання вихідного гепарину дуже низької молекулярної маси, що має активність аХа, яка дорівнює 158М.од./мг

Гепарин дуже низької молекулярної маси (НТВРМ), що використовується як вихідний продукт в прикладах 2, 3, 4, 5, отримують згідно із заявкою на патент WO 2004/033503 виходячи з гепарину натрію, здійснюючи стадії від а) до f), які описані вище, причому стадію деполімеризації здійснюють в присутності 2-трет.бутиліміно-2-діетиламіно-1,3-диметилпергідро-1,3,2-діаза-фосфорину і при процентному вмісті води нижче за 0,6%.

Характеристики отриманого гепарину дуже низької молекулярної маси

Характеристики отриманого деполімеризованого гепарину наступні:

Середня молекулярна маса: 2450 Дальтон

Активність анти-Ха: 158М.од./мг

Активність анти-IIa: 2,1М.од./мг

Співвідношення активність анти-Ха/активність анти-IIa: 75

Приготування 3: НТВРМ, сіль бензетонію

Перетворення однієї солі НТВРМ в сіль бензетонію (відповідне стадії а) способу):

У колбу Ерленмєєра А об'ємом 500мл завантажують 12,53г (20,7ммоль) солі натрію НТВРМ, отриманої згідно з приготуванням 1, і розчиняють в 85мл води (жовтий розчин).

У колбу Ерленмєєра В об'ємом 100мл завантажують 31,62г (70,5ммоль) хлориду бензетонію разом з 250мл води (розчин безбарвний).

Вміст колби В виливають в колбу А і суміш перемішують близько 1 години при кімнатній температурі. Залишають відстоюватися близько 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють таким же об'ємом води (250мл). Перемішують близько 15 хвилин і залишають відстоюватися приблизно 30 хвилин. Надосадову частину видаляють і замінюють таким же об'ємом води (250мл). Суміш перемішують близько 15 хвилин і залишають відстоюватися приблизно 30 хвилин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (250мл). Суміш перемішують близько 15 хвилин, потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази за допомогою 200мл води. Тверду вологу речовину бежевого кольору центрифугують, потім сушать при 80°C близько 18 годин в сушильній шафі під зниженим тиском (6кПа). Отримують 35,56г солі бензетонію НТВРМ. Отриманий вихід становить 89%.

Приготування 4: Перетворення солі НТВРМ в сіль бензетонію (відповідне стадії а) способу):

У колбу Ерленмєєра А об'ємом 1л завантажують 17,93г (30,2ммоль) солі натрію НТВРМ, отриманої згідно з приготуванням 2, і розчиняють в 120мл води (жовтий розчин).

У колбу Ерленмєєра В об'ємом 500мл завантажують 45г (0,1моль) хлориду бензетонію разом з 360мл води (розчин безбарвний).

Вміст колби В виливають в колбу А і суміш перемішують близько 1 години при кімнатній температурі. Залишають відстоюватися близько 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють таким же об'ємом води (500мл). Перемішують



близько 15 хвилин і залишають відстоюватися приблизно 30 хвилин. Надосадову частину видаляють і замінюють таким же об'ємом води (500мл). Суміш перемішують близько 15 хвилин, потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази за допомогою 200мл води. Тверду вологу речовину бежевого кольору центрифугують, потім сушать при 80°C близько 48 годин в сушильній шафі під зниженим тиском (6кПа). Отримують 49,5г солі бензетонію НТВРМ.

Отриманий вихід становить 87%.

Приклад 1:

Гепарин дуже низької молекулярної маси (НТВРМ), отриманий способом згідно з винаходом, що включає стадію етерифікації до 77%, і стадію деполімеризації основою, які є похідним фосфазену, в безводному середовищі

Етерифікація НТВРМ (стадія b) способом):

35,39г (18,3ммол) солі бензетонію НТВРМ, отриманої згідно з приготуванням 3 (при вмісті води 0,20%), розчиняють в 183,3г сухого дихлорметану і завантажують в тригорлу колбу об'ємом 500мл. Додають 29,5мл (25,7ммол) бензилхлориду при температурі 30°C. Після приблизно 23 годин реакції при 30°C ступінь етерифікації становить 77%. Після охолодження до кімнатної температури (22±3°C) реакційну суміш виливають в 490мл 10%-го розчину ацетату натрію в метанолі. Суміш перемішують протягом приблизно 1 години, потім залишають відстоюватися приблизно 1 година. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (250мл). Перемішують приблизно 30 хвилин, потім залишають відстоюватися близько 45 хвилин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (250мл). Залишають відстоюватися близько 16 годин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (350мл). Перемішують близько 5 хвилин і суспензію фільтрують. Осад на фільтрі промивають 2 рази за допомогою 50мл метанолу, центрифугують і сушать при 40°C під зниженим тиском (6кПа) протягом близько 18 годин. Отримують 34,48г неочищеної солі складного бензилового ефіру НТВРМ зі ступенем етерифікації 77%.

Очищення солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ, (стадія b) способом).

Розчиняють 34,48г неочищеної солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ в 350мл 10% водного розчину NaCl. Розчин виливають в 1,57л метанолу. Суспензію перемішують близько 40 хвилин, потім залишають відстоюватися протягом близько 16 годин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (1,5л). Перемішують близько 1 години, потім залишають відстоюватися близько 1,5 години. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (1,2л). Перемішують приблизно 15 хвилин і потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази за допомогою 50мл метанолу. Твердий вологий продукт білого кольору центрифугують і сушать при 40°C під зниженим тиском (6кПа) протягом близько 18 годин. Отримують 6,07г солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ.

Вихід реакції етерифікації становить 50%.

Перетворення солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ в сіль бензетонію (стадія c) способом):

У колбі Ерленмеєра А об'ємом 250мл розчиняють би г (9,14ммол) натрієвої солі складного бензилового ефіру НТВРМ в 40мл води.

Одночасно в колбу Ерленмеєра В об'ємом 250мл завантажують 13,93г (31ммол) хлориду бензетонію і 110мл води.

Вміст колби В виливають в колбу А. Суспензію перемішують близько 1 години при кімнатній температурі (22±3°C), потім залишають відстоюватися 1 година. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (140мл). Перемішують близько 15 хвилин і відстоюють 1 годину. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (140мл). Перемішують приблизно 15 хвилин і відстоюють близько 30 хвилин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (140мл). Перемішують близько 5 хвилин і потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази за допомогою 50мл води, центрифугують, потім сушать при 80°C при зниженому тиску (6кПа) протягом приблизно 18 годин. Отримують 17,43г солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ.

Вихід становить 100%.

Деполімеризація солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ в безводному середовищі: віст води, що не визначається <0,01, (стадія d) способом)

У тригорлу колбу об'ємом 250мл завантажують 17,43г (9,14ммол) НТВРМ, отриманого згідно з приготуванням 2, і 122мл сухого дихлорметану. Додають 17,4г молекулярних сита 4А. Вміст перемішують близько 18 годин при кімнатній температурі (22±3°C) в атмосфері аргону.

Сито відділяють від суміші перенесенням розчину в тригорлу колбу об'ємом 250мл. Додають 2,64мл (9,14ммол) 2-трет.бутиліміно-2-діетиламіно-1,3-диметилпергідро-1,3,2-діазафосфорину і перемішують протягом 24 годин при температурі 22±3°C в атмосфері аргону.

Перетворення четвертинної солі амонію в сіль натрію (стадія e) способом)

У колбі Ерленмеєра об'ємом 2л отримують 730мл 10%-го розчину ацетату натрію в метанолі. Додають в розчин 8,71г целіту Гіфло суперсель. Реакційну суміш виливають в метанольний розчин, що підтримується при температурі близько 4°C. Суспензію перемішують при цій же температурі протягом приблизно 15 хвилин. Відстоюють приблизно 45 хвилин при кімнатній температурі, потім надосадову частину видаляють і замінюють її тією ж кількістю метанолу (450мл). Перемішують близько 15 хвилин, і відстоюють приблизно 45 хвилин. Надосадову частину знов видаляють і замінюють тією ж кількістю метанолу (420мл). Перемішують близько 15 хвилин, потім фільтрують через фритоване скло n°3. Осад на фільтрі промивають 2 рази за допомогою 70мл метанолу, центрифугують і сушать протягом 18 годин при температурі 50°C і при зниженому тиску (6кПа). Отримують 4,35г неочищеного деполімеризованого НТВРМ (сіль натрію) на целіті (8,71г).

Вихід становить 72,5%.

Омилення неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ, (стадія f1) способу):

Розчиняють 4,35г (6,63ммол) неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ на целіті в 46мл води, потім фільтрують через фритоване скло n°3. Целіт промивають двома порціями по 30мл води. Фільтрат завантажують в колбу Ерленмеєра об'ємом 500мл. Вводять 823мкл (9,94ммол) 35%-го розчину луку натрію при температурі близько 4°C. Перемішують близько 3 годин при цій же температурі. Середовище нейтралізують додаванням 1Н розчину HCl, потім додають 11,5г NaCl і 80мл метанолу. Після приблизно 15 хвилин перемішування додають 210мл метанолу. Суспензію перемішують близько 1 години і відстоюють протягом 30 хвилин. Надосадову частину видаляють і замінюють тією ж кількістю метанолу (230мл). Перемішують близько 15 хвилин і відстоюють протягом 30 хвилин. Надосадову частину видаляють і замінюють тією ж кількістю метанолу (210мл). Перемішують приблизно 15 хвилин, потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 2 рази за допомогою 9мл метанолу, центрифугують і сушать близько 18 годин при температурі 50°C під зниженим тиском (6кПа). Отримують 2,95г неочищеного деполімеризованого НТВРМ (сіль натрію). Вихід становить 73,7%. Очищення неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ, (стадія f2) способу):

У тригорлу колбу об'ємом 50мл завантажують 1,5г неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ і 16мл води. Розчин нагрівають при 40°C протягом 10 хвилин. Значення рН доводять до 9,7 приблизно шляхом додавання 0,1 Н розчину луку натрію. Розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм, потім додають 84мкл 30%-го водного розчину перекису водню. Суміш перемішують 2 години при кімнатній температурі, підтримуючи постійним значення рН на рівні  $9,7 \pm 0,1$  шляхом додавання 0,1 Н розчину луку натрію. Реакційну суміш нейтралізують додаванням 0,1 Н HCl, потім 2г NaCl. Після перемішування протягом приблизно 10 хвилин розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм. Вливають 14мл метанолу при температурі близько 4°C. Розчин перемішують приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі. Додають потім 36мл метанолу і суспензію перемішують близько 1 години. Перемішування потім припиняють і залишають відстоюватися протягом приблизно 30 хвилин. Надосадову частину відділяють і видаляють (40мл). До осаду, що випав, додають 40мл метанолу і перемішують близько 10 хвилин. Повторно дають відстоюватися осаду протягом приблизно 30 хвилин. Надосадову частину відділяють і видаляють (45мл). Додають 45мл метанолу і осад у вигляді суспензії фільтрують. Отриманий на фільтрі білий осад промивають двома порціями по 3мл метанолу. Твердий вологий продукт центрифугують, потім сушать під зниженим тиском (6кПа) при температурі близько 50°C. Після приблизно 18 годин сушіння отримують 1,303г очищеного деполімеризованого НТВРМ (сіль натрію). Вихід становить 86,8%.

Характеристики отриманого деполімеризованого НТВРМ

Середня молекулярна маса: 1950 Дальтон

Показник пол і дисперсності: 1,1

Активність анти-Ха: 283М.од./мг

Активність alla: не виявлена (менше за 0,2Од./мг)

Приклад 2.

Гепарин дуже низької молекулярної маси (НТВРМ), отриманий способом згідно з винаходом, що включає стадію етерифікації до 49% і стадію деполімеризації основою, які є похідним фосфазену, в безводному середовищі.

Етерифікація НТВРМ (стадія b) способу):

13,29г (7,6ммол) солі бензетонію НТВРМ, отриманої згідно з приготуванням 4, розчиняють в 70,43г безводного дихлорметану і завантажують в тригорлу колбу об'ємом 100мл (вміст води в реакційному середовищі становить 0,073%). Додають 12,3мл (107ммол) бензилхлориду при температурі 30°C. Після приблизно 7 годин реакції при 30°C ступінь етерифікації становить 49%. Після охолодження реакційну суміш вливають в 160мл 12%-го розчину ацетату натрію в метанолі. Суміш перемішують протягом 1 години при кімнатній температурі, потім відстоюють приблизно 16 годин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (100мл). Перемішують приблизно 1 годину, потім залишають відстоюватися близько 1 години. Надосадову частину знов видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (100мл). Перемішують близько 5 хвилин і суспензію фільтрують. Осад на фільтрі промивають 2 рази по 40мл метанолу, центрифугують і сушать в сушильній шафі при 40°C під зниженим тиском (6кПа) протягом близько 18 годин. Отримують 3,90г неочищеної солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ зі ступенем етерифікації 49%.

Очищення солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ (етерифікованого до 49%) (стадія b) способу):

Розчиняють 3,90г неочищеної солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ в 39мл 10%-го водного розчину NaCl. Розчин вливають в 176мл метанолу. Суспензію перемішують близько 15 хвилин, потім відстоюють протягом 2 годин. Суміш фільтрують. Осад на фільтрі суспензують в 175мл метанолу і перемішують протягом 10 хвилин. Фільтрують і осад на фільтрі промивають двома порціями по 10мл метанолу. Твердий вологий продукт білого кольору центрифугують і сушать в сушильній шафі при 40°C під зниженим тиском (6кПа) протягом близько 18 годин. Отримують 2,62г солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ.

Загальний вихід реакції етерифікації становить 57,3%.

Перетворення солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ в сіль бензетонію (стадія c) способу):

Розчиняють 2,62г (4,37ммол) солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ в 20мл води (колба Ерленмеєра «А»). Одночасно в колбу Ерленмеєра «В» завантажують 5,92г (13,2ммол) хлориду бензетонію і 60мл води. Вміст колби «В» вилива-

ють в колбу «А». Суспензію перемішують близько 1 години при кімнатній температурі, потім залишають відстоюватися 1 годину. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (70мл). Перемішують близько 15 хвилин і відстоюють 1 годину. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (70мл). Перемішують ще приблизно протягом 5 хвилин і фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази по 50мл води, центрифугують, потім сушать в сушильній шафі при 80°C і при зниженому тиску (6кПа) протягом приблизно 18 годин. Отримують 6,85г солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ.

Вихід становить 99%. Вміст води в солі бензетонію 0,6%.

Деполімеризація солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ.

У тригорлу колбу об'ємом 100мл завантажують 6,80г (4,3ммоль) НТВРМ і 54мл сухого дихлорметану. Суміш нагрівають до 30°C, потім перемішують до повного розчинення. Вміст води в реакційному середовищі складає близько 0,05%. Додають 1,25мл (4,3ммоль) 2-трет.бутиліміно-2-діетиламіно-1,3-диметилпергідро-1,3,2-діазафосфорину і перемішують протягом 24 годин при температурі 30°C в інертній атмосфері.

Перетворення солі четвертинного амонію в сіль натрію (стадія е) способом)

У колбі Ерленмеєра об'ємом 1л отримують 270мл 10%-го розчину ацетату натрію в метанолі. Реакційну суміш вливають в метанольний розчин, підтримуючи температуру близько 4°C. Суспензію перемішують при кімнатній температурі протягом приблизно 1 години. Відстоюють протягом 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють її тією ж кількістю метанолу (165мл). Перемішують ще близько 1 годину і залишають відстоюватися протягом 1 години. Надосадову частину знов видаляють і замінюють тією ж кількістю метанолу (170мл). Перемішують близько 15 хвилин, потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 порціями по 40мл метанолу, центрифугують і сушать протягом 18 годин в сушильній шафі при температурі 50°C і зниженому тиску (6кПа). Отримують 2,29г неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ.

Вихід становить 89%.

Омилення неочищеної солі натрію НТВРМ (стадія f1) способом):

Розчиняють 2,29г (3,8ммоль) неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ в 23мл води. Розчин фільтрують через мембрану 0,8мкм, потім завантажують в тригорлу колбу об'ємом 100мл. Вводять 575мкл (5,73ммоль) 30%-ого розчину лугу натрію при температурі близько 3°C. Перемішують близько 2 годин при цій же температурі.

Половину реакційної суміші нейтралізують додаванням крижаної оцтової кислоти і потім вводять 367мг твердого ацетату натрію і 13мл метанолу. Розчин перемішують близько 15 хвилин, потім додають 65мл метанолу. Отриману суспензію перемішують близько 30 хвилин, потім відстоюють близько 16 годин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (36мл). Пе-

ремішують ще приблизно 30 хвилин і залишають відстоюватися близько 30 хвилин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (16мл). Перемішують ще приблизно 15 хвилин і фільтрують через мембрану 0,22мкм.

Осад на мембрані промивають 2 рази по 5мл метанолу, центрифугують і сушать при зниженому тиску (6кПа) протягом 18 годин в сушильній шафі при температурі 50°C. Отримують 563мг неочищеного деполімеризованого НТВРМ (сіль натрію).

Вихід становить 52,6%.

Очищення неочищеного деполімеризованого НТВРМ (сіль натрію) осадженого за допомогою AcONa (стадія f2) способом):

У тригорлу колбу об'ємом 100мл завантажують 560мг неочищеного деполімеризованого НТВРМ (сіль натрію) і 5,6мл води. Розчин коричневого кольору нагрівають при 40°C протягом 10 хвилин. Значення рН доводять до 9,7 шляхом додавання 0,1 Н лугу натрію. Розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм, потім додають 28мкл 30%-го водного розчину перекису водню. Суміш перемішують 2 години при кімнатній температурі, підтримуючи постійним значення рН на рівні  $9,5 \pm 0,1$  шляхом додавання 0,1 Н лугу натрію. Реакційну суміш нейтралізують додаванням 0,1 Н HCl, потім вводять 620мг NaCl. Після перемішування протягом 10 хвилин розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм. Вливають 4,35мл метанолу при температурі близько 4°C. Розчин перемішують 15 хвилин при кімнатній температурі. Додають 11,2мл метанолу. Суспензію перемішують 1 годину. Перемішування потім припиняють і залишають відстоюватися протягом 1 години. Надосадову частину відділяють і видаляють (13,5мл). До осаду, що випав, додають 13,5мл метанолу і перемішують протягом 15 хвилин. Повторно відстоюють протягом приблизно 30 хвилин з отриманням осаду. Надосадову частину відділяють і видаляють (13мл). Додають 13мл метанолу і осад у вигляді суспензії фільтрують. Отриманий на фільтрі білий осад промивають 2 порціями по 5мл метанолу. Твердий вологий продукт центрифугують, потім сушать під зниженим тиском (6кПа) і при температурі близько 50°C. Після 18 годин сушіння отримують 376г очищеного деполімеризованого НТВРМ (сіль натрію). Вихід становить 67%.

Характеристики отриманого деполімеризованого НТВРМ:

Активність анти-Ха: 191М.од./мг

Середня молекулярна маса: 2100 Да

Приклад 3:

Гепарин дуже низької молекулярної маси (НТВРМ), отриманий способом згідно з винаходом, що включає стадію етерифікації до 73% і стадію деполімеризації основою, які є похідним фосфазену, в безводному середовищі

Етерифікація НТВРМ (стадія b) способом):

13,7г (7,3ммоль) солі бензетонію НТВРМ, отриманої згідно з приготуванням 4, розчиняють в 73,67г безводного дихлорметану і завантажують в тригорлу колбу об'ємом 100мл (вміст води в реакційному середовищі становить 0,23%). Додають 13мл (113ммоль) бензилхлориду при температурі 30°C. Після приблизно 20 годин реакції при 30°C

ступінь етерифікації становить 73%. Після охолодження так кімнатної температури реакційну суміш вливають в 210мл 12%-го розчину ацетату натрію в метанолі. Суміш перемішують протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, потім відстоюють протягом приблизно 1,5 години. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (140мл). Перемішують 15 хвилин і суспензію фільтрують. Осад на фільтрі промивають 2 порціями по 100мл метанолу, центрифугують і сушать приблизно 18 годин в сушильній шафі при 40°C під зниженим тиском (6кПа). Отримують 13,3г неочищеної солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ зі ступенем етерифікації 73%.

Очищення солі натрію складного бензилового ефіру (етерифікованого до 73%) НТВРМ (стадія b) способом).

Розчиняють 13,3г неочищеної солі натрію складного бензилового ефіру в 133мл 10%-го водного розчину NaCl. Розчин вливають в 600мл метанолу. Суспензію перемішують близько 15 хвилин, потім відстоюють протягом приблизно 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (400мл). Перемішують близько 5 хвилин і потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази по 100мл метанолу. Твердий вологий продукт білого кольору центрифугують і сушать в сушильній шафі при 40°C під зниженим тиском (6кПа) протягом приблизно 18 годин. Отримують 2,33г солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ.

Вихід реакції етерифікації становить 49,6%.

Перетворення солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ (стадія c) способом):

Розчиняють 2,27г (3,53ммоль) натрієвої солі складного бензилового ефіру НТВРМ в 15мл води в колбі Ерленмєєра «А» об'ємом 100мл. Одночасно в колбу Ерленмєєра «В» об'ємом 100мл завантажують 5,22г (11,6ммоль) хлориду бензетонію і 55мл води.

Вміст колби «В» вливають в колбу «А». Суспензію перемішують близько 1 години при кімнатній температурі, потім залишають відстоюватися приблизно 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (50мл). Перемішують близько 15 хвилин і відстоюють приблизно 1 годину. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (50мл). Перемішують ще 5 хвилин, потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази по 50мл води, центрифугують, потім сушать в сушильній шафі при 80°C при зниженому тиску (6кПа) протягом приблизно 18 годин. Отримують 5,67г солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ.

Вихід становить 98%. Вміст води в отриманому продукті становить 1%.

Деполімеризація солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ (стадія d) способом):

У тригорлу колбу об'ємом 100мл завантажують 5,45г (3,3ммоль) НТВРМ і 40мл сухого дихлорметану. Вміст води в суміші складає близько 0.1%. Суміш нагрівають до 30°C. Додають 958мкл (3,3ммоль) 2-трет.бутиліміно-2-діетиламіно-1,3-диметилпергідро-1,3,2-діаза-фосфорину і перемі-

шують протягом 24 годин при температурі 30°C в атмосфері аргону.

Перетворення солі четвертинного амонію в сіль натрію (стадія e) способом)

У колбі Ерленмєєра об'ємом 500мл отримують 200мл 10%-го розчину ацетату натрію в метанолі. Реакційну суміш вливають в метанольний розчин, підтримуючи температуру близько 4°C. Суспензію перемішують при кімнатній температурі протягом приблизно 1 години. Відстоюють протягом приблизно 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють її тим же об'ємом метанолу (150мл). Перемішують ще 30 хвилин і залишають відстоюватися близько 30 хвилин. Надосадову частину знов видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (150мл). Перемішують близько 15 хвилин, потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази по 50мл метанолу, центрифугують і сушать близько 18 годин при температурі 50°C і зниженому тиску (6кПа). Отримують 1,40г неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ.

Вихід складає 65,8%.

Омилення неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ, (стадія f1) способом):

Розчиняють 1,40г (2,18ммоль) неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ в 14мл води. Розчин потім завантажують в тригорлу колбу об'ємом 100мл. Вводять 351мкл (3,5ммоль) 30% луку натрію при температурі близько 4°C. Перемішують близько 2 годин при цій же температурі. Розчин нейтралізують доданням крижаної оцтової кислоти (100%). Потім вводять 7г твердого ацетату натрію і 130мл метанолу. Отриману суспензію перемішують 30 хвилин, потім відстоюють близько 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (80мл). Перемішують ще приблизно 30 хвилин і залишають відстоюватися протягом приблизно 16 годин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (80мл). Перемішують ще приблизно 15 хвилин і фільтрують через мембрану 0,45мкм. Осад на мембрані промивають 2 рази по 10мл метанолу, центрифугують і сушать протягом 18 годин при температурі 50°C і зниженому тиску (6кПа). Отримують 1,15г (вихід 89,4%) неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ.

Вихід становить 89,4%.

Очищення неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ, (стадія f2) способом):

У тригорлу колбу об'ємом 100мл завантажують 373мг неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ і 3,7мл води. Розчин нагрівають при 40°C протягом 10 хвилин. Значення рН доводять до 9,5 шляхом додання 0,1 Н луку натрію. Розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм, потім додають 18мкл 30%-го водного розчину перекису водню. Суміш перемішують близько 2 годин при кімнатній температурі, підтримуючи постійним рН на рівні 9,5±0,1 шляхом додання 0,1 Н луку натрію. Реакційну суміш нейтралізують доданням Про, 1Н HCl, потім додають 430мг NaCl. Після перемішування протягом приблизно 10 хвилин розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм. Вливають 3мл метанолу при температурі близько 4°C. Розчин перемішують 15 хвилин при кімнатній температурі. Додають

7,7мл метанолу. Суспензію перемішують близько 1 години. Перемішування потім припиняють і залишають відстоюватися протягом приблизно 40 хвилин. Надосадову частину відділяють і видаляють (10мл). До осаду, що випав, додають 10мл метанолу і перемішують протягом 15 хвилин. Повторно відстоюють до отримання осаду протягом приблизно 30 хвилин. Надосадову частину відділяють і видаляють (10мл). Додають 10мл метанолу і осад у вигляді суспензії фільтрують через мембрану 0,45мкм. Отриманий на фільтрі білий осад промивають 4 порціями по 5мл метанолу. Твердий вологий продукт центрифугують, потім сушать під зниженим тиском (6кПа) при температурі близько 50°C. Після 18 годин сушіння отримують 199мг очищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ. Вихід становить 54%.

Характеристики отриманого деполімеризованого НТВРМ:

Середня молекулярна маса: 2000 Да

Активність анти-Ха: 252М.од./мг

Показник полідисперсності: 1,1

Приклад 4:

НТВРМ, отриманий способом згідно з винаходом, що включає стадію етерифікації до 96% і стадію деполімеризації за допомогою ВЕМР

Етерифікація НТВРМ (стадія b) способом):

14,45г (7,7ммоль) солі бензетонію НТВРМ, отриманої згідно з приготуванням 4, розчиняють в 75,79г безводного дихлорметану і завантажують в тригорлу колбу об'ємом 250мл (вміст води в реакційному середовищі становить 0,20%). Додають 12,4мл (108ммоль) бензилхлориду при температурі 30°C. Після приблизно 26 годин реакції при 30°C ступінь етерифікації становить 96%. Після охолодження до кімнатної температури реакційну суміш вливають в 180мл 12%-го розчину ацетату натрію в метанолі. Суміш перемішують протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, потім залишають відстоюватися протягом приблизно 30 хвилин. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (150мл). Перемішують близько 15 хвилин, потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 2 порціями по 100мл метанолу, центрифугують і сушать близько 18 годин при 40°C під зниженим тиском (6кПа). Отримують 3,67г неочищеної солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ зі ступенем етерифікації 96%.

Очищення солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ (етерифікованого до 96%) (стадія b) способом.

Розчиняють 3,67г неочищеної солі натрію бензилового ефіру НТВРМ в 37мл 10%-го водного розчину NaCl (3,7г NaCl в 37мл води). Розчин вливають в 167мл метанолу. Суспензію перемішують близько 15 хвилин, потім відстоюють протягом приблизно 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом метанолу (38мл). Перемішують близько 5 хвилин і фільтрують. Осад на фільтрі промивають 2 рази по 30мл метанолу. Твердий вологий продукт білого кольору центрифугують і сушать близько 18 годин при 40°C під зниженим тиском (6кПа). Отримують 2,76г солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ.

Вихід реакції етерифікації становить 54,4%.

Перетворення солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ в сіль бензетонію (стадія c) способом):

Розчиняють 2,83г (4,29ммоль) солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ в 20мл води в колбі Ерленмєєра «А» об'ємом 100мл. Одночасно в колбу Ерленмєєра «В» об'ємом 100мл завантажують 6,35г (14,2ммоль) хлориду бензетонію і 50мл води.

Вміст колби «В» вливають в колбу «А». Суспензію перемішують близько 1 години при кімнатній температурі, потім відстоюють приблизно 1 годину. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (60мл). Перемішують близько 15 хвилин і відстоюють приблизно 1 годину. Надосадову частину видаляють і замінюють тим же об'ємом води (60мл). Перемішують ще 5 хвилин, потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають 4 рази по 50мл води, центрифугують, потім сушать близько 18 годин при 80°C і зниженому тиску (6кПа). Отримують 7,0г солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ.

Вихід складає близько 100%. Вміст води - 0,23%.

Деполімеризація солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ (стадія d) способом):

У тригорлу колбу об'ємом 50мл завантажують 3,67г (2,3ммоль) НТВРМ і 27мл сухого дихлорметану. Суміш нагрівають до 30°C. Додають 676мкл (2,3ммоль) 2-трет.бутиліміно-2-діетиламіно-1,3-диметилпергідро-1,3,2-діаза-фосфорину і перемішують протягом 24 годин при температурі 30°C.

Перетворення четвертинної солі амонію в сіль натрію (стадія e) способом)

У колбі Ерленмєєра об'ємом 250мл отримують 150мл 10%-го розчину ацетату натрію в метанолі. У метанольний розчин вливають реакційну суміш, підтримуючи температуру близько 4°C. Суспензію перемішують при кімнатній температурі протягом приблизно 1 години. Відстоюють протягом приблизно 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють її тією ж кількістю метанолу (100мл). Перемішують 30 хвилин і залишають відстоюватися 30 хвилин. Надосадову частину знов видаляють і замінюють тією ж кількістю метанолу (100мл). Перемішують близько 15 хвилин і фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази по 40мл метанолу, центрифугують і сушать близько 18 годин при температурі 50°C і зниженому тиску (6кПа). Отримують 966мг деполімеризованої солі натрію НТВРМ.

Вихід становить 64%.

Омилення солі натрію складного бензинового ефіру НТВРМ (стадія f1) способом):

Розчиняють 942мг (1,43ммоль) деполімеризованої солі натрію НТВРМ в 9,5мл води. Розчин завантажують в тригорлу колбу об'ємом 100мл. Вводять 236мкл (2,35ммоль) 30%-ого лугу натрію при температурі близько 4°C. Перемішують близько 2 годин при цій же температурі. Розчин нейтралізують доданням крижаної оцтової кислоти (100%). Потім вводять 4,5г твердого ацетату натрію і 85мл метанолу. Суспензію перемішують близько 30 хвилин, потім відстоюють близько 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють

ють тією ж кількістю метанолу (40мл). Перемішують ще приблизно 30 хвилин і залишають відстоюватися протягом приблизно 16 годин. Надосадову частину видаляють і замінюють тією ж кількістю метанолу (40мл). Перемішують ще приблизно 30 хвилин і фільтрують через мембрану 0,45мкм.

Осад на мембрані промивають 2 рази по 10мл метанолу, центрифугують і сушать протягом 18 годин при температурі 50°C і зниженому тиску (6кПа). Отримують 776мг неочищених деполімеризованої солі натрію НТВРМ.

Вихід становить 91,4%.

Очищення неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ (стадія f2) способом):

У тригорлу колбу об'ємом 25мл завантажують 758мг неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ і 7,6мл води. Розчин нагрівають при 40°C протягом 10 хвилин. Значення рН доводять до 9,5 шляхом додання 0,1 Н лугу натрію. Розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм, потім додають 38мкл 30%-го водного розчину перекису водню. Суміш перемішують близько 2 годин при кімнатній температурі, підтримуючи постійним рН на рівні  $9,5 \pm 0,1$  шляхом доданням 0,1Н лугу натрію. Реакційну суміш нейтралізують при доданні 1Н НСІ і додають 880мг NaCl. Після перемішування близько 10 хвилин розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм. Вливають 6,2мл метанолу при температурі близько 4°C. Розчин перемішують приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі. Додають 16мл метанолу і суспензію перемішують близько 1 години. Перемішування потім припиняють і суспензію фільтрують. Отриманий на фільтрі білий осад промивають 2 порціями по 15мл метанолу. Твердий вологий продукт центрифугують, потім сушать під зниженим тиском (6кПа) при температурі близько 50°C. Після, приблизно, 18 годин сушіння отримують 490мг очищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ. Вихід становить 65%.

Характеристики отриманого деполімеризованого НТВРМ:

Середня молекулярна маса: 2000 Да

Показник полідисперсності: 1,1

Активність анти-Ха: 205М.од./мг

Приклад 5:

НТВРМ, отриманий способом згідно з винаходом, що включає стадію етерифікації до ступеню етерифікації 96% і стадію деполімеризації за допомогою трет.бутилімінофосфору.

Деполімеризація солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ (стадія d) способом):

Завантажують 3,67г (2,3ммол) солі бензетонію складного бензилового ефіру НТВРМ (етерифікованого до 96%), отриманої в прикладі 4, що містить 0,23% води, завантажують в тригорлу колбу об'ємом 50мл і 30мл сухого дихлорметану. Суміш нагрівають до 30°C. Додають 595мкл (2,3ммол) трет.бутиліміно-трис(диметиламіно)фосфору і перемішують 24 години при 30°C.

Перетворення четвертинної солі амонію в сіль натрію (стадія e) способом): У колбі Ерленмеєра об'ємом 250мл отримують 160мл 10%-го розчину ацетату натрію в метанолі. У метанольний розчин вливають реакційну суміш, підтримуючи темпера-

туру близько 4°C. Суспензію перемішують при кімнатній температурі протягом приблизно 1 години. Відстоюють протягом приблизно 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють її тією ж кількістю метанолу (120мл). Перемішують близько 30 хвилин і залишають відстоюватися 30 хвилин. Надосадову частину знов видаляють і замінюють тією ж кількістю метанолу (125мл). Перемішують близько 15 хвилин і фільтрують. Осад на фільтрі промивають 3 рази по 40мл метанолу, центрифугують і сушать близько 18 годин при температурі 50°C і зниженому тиску (6кПа). Отримують 982мг неочищених деполімеризованої солі натрію НТВРМ. Вихід становить 65%.

Омилення неочищеної деполімеризованої солі натрію складного бензилового ефіру НТВРМ (стадія f1) способом):

Розчиняють 980мг (1/49ммол) неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ в 10мл води. Розчин завантажують в тригорлу колбу об'ємом 100мл. Вводять 246мкл (2,45ммол) 30%-ого лугу натрію при температурі близько 4°C. Перемішують близько 2 годин при цій же температурі. Розчин нейтралізують доданням крижаної оцтової кислоти (100%). Потім вводять 4,9г твердого ацетату натрію і 95мл метанолу. Суспензію перемішують близько 30 хвилин, потім відстоюють близько 1 години. Надосадову частину видаляють і замінюють тією ж кількістю метанолу (60мл). Перемішують ще приблизно 30 хвилин і залишають відстоюватися протягом приблизно 16 годин. Надосадову частину видаляють і замінюють тією ж кількістю метанолу (60мл). Перемішують ще приблизно 30 хвилин і фільтрують через мембрану 0,45мкм. Осад на мембрані промивають 2 рази по 10мл метанолу, центрифугують і сушать близько 18 годин при температурі 50°C і зниженому тиску (6кПа). Отримують 809мг неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ. Вихід становить 91,6%.

Очищення неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ (стадія f2) способом):

У тригорлу колбу об'ємом 25мл завантажують 792мг неочищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ і 8мл води. Розчин нагрівають протягом 10 хвилин при 40°C. Значення рН доводять до 9,5 шляхом додання 0,1 Н лугу натрію. Розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм, потім додають 39,6мкл 30%-го водного розчину перекису водню. Суміш перемішують близько 2 годин при кімнатній температурі, підтримуючи постійним рН на рівні  $9,5 \pm 0,1$  шляхом доданням 0,1 Н лугу натрію. Реакційну суміш нейтралізують при доданні 1Н НСІ і вводять 1,04г NaCl. Після перемішування близько 10 хвилин розчин фільтрують через мембрану 0,45мкм. Вливають 7,3мл метанолу при температурі близько 4°C. Розчин перемішують приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі. Додають 18,8мл метанолу і суспензію перемішують близько 1 години. Перемішування потім припиняють і суспензію фільтрують. Отриманий на фільтрі осад промивають 3 порціями по 15мл метанолу. Твердий вологий продукт центрифугують, потім сушать під зниженим тиском (6кПа) при температурі близько 50°C. Після, приблизно, 18 годин сушіння

отримують 538мг очищеної деполімеризованої солі натрію НТВРМ. Вихід становить 67,9%.

Характеристики отриманого деполімеризованого НТВРМ:

Середня молекулярна маса: 2100 Да

Показник полідисперсності: 1,1

Активність анти-Ха: 209М.од./мг

Приклад 6:

НТВРМ, отриманий способом згідно з винаходом, що включає додаткову стадію хроматографічного розділення з видаленням дисахаридних і тетрасахаридних фракцій.

Суміш олігосахаридів, описану в прикладі 1 (286мг), розчиняють в 20мл рухомої фази (водний розчин бікарбонату натрію з концентрацією 0,2мол/л). Умови хроматографії наступні:

Рухомі фаза: розчин бікарбонату натрію 0,2мол/л

Стаціонарна фаза: Гель біогель Р6

Колонка: довжина 1м, діаметр 5см

Довжина хвилі: 240нм

Вищі або гексасахаридні фракції, збирають і об'єднують.

Потім їх нейтралізують оцтовою кислотою і концентрують до отримання розчину ацетату натрію з концентрацією 200г/л. До отриманого розчину при перемішуванні додають 5 об'ємів метанолу. Суспензію перемішують близько 18 годин, потім фільтрують на мембрані 0,45мкм. Осад на мембрані сушать протягом приблизно 6 годин при температурі близько 40°C при зниженому тиску (6кПа). Отриманий продукт знов осаджують, потім розчиняють в мінімальній кількості води і видаляють солі на колонці Сефадекс G10. Після концентрування знесолених фракцій і подальшої ліофілізації отримують 109мг продукту. Вихід становить 38%.

Отримана суміш олігосахаридів має наступні характеристики:

Активність анти-Ха: 403М.од./мг

Процентний вміст олігосахаридів наступний:

Мw (Да)	Полідисперсність	Ді %	Тетра %	Гекса %	Окта %	Дека %	Дека %
2150	1,0	0	0	53,83	32,58	10,5	3,5

Фармакологічна активність сполук згідно з винаходом:

Приклади	Середня молекулярна маса	Активність анти-Ха М.од. /мг	Активність анти-ІІа
1	1950	283	<0,2
2	2100	191	0
3	2000	252	0
4	2000	205	0
5	2100	209	0
6	2150	403	0

Процентний вміст гексасахариду ΔІІа-ІІs-Іs в сполуках згідно з винаходом:

Приклади	Вміст в % гексасахаридної фракції	Вміст в % гексасахариду ΔІІа-ІІs-Іs в гексасахаридній фракції
1	31%	46%
2	30%	26%
3	33%	33,5%
4	32%	30,8%
5	31,5%	28,7%
6	53,8%	46%