

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 036 922**

21 Número de solicitud: 009101505

15 Folleto corregido: B1

Texto afectado: Reivindicaciones

INID afectado: 51

48 Fecha de publicación de la corrección: 30.07.2012

51 Int. Cl.:

**C08B 37/10** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CORREGIDA

B9

22 Fecha de presentación: **25.06.1991**

30 Prioridad:  
**26.06.1990 FR 90 08013**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.1993**

Fecha de la concesión: **29.11.1993**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:  
**19.02.2007**

Cumplimiento de sentencia BOPI: ' \$' \$+ " & \$ % &

45 Fecha de anuncio de la concesión: \$ % 0 ' . % - (

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
\$ % 0 ' . % - (

73 Titular/es:  
**AVENTIS PHARMA, S.A.**  
**20, AVENUE RAYMOND ARON**  
**92160 ANTHONY-FRANCE, FR**

72 Inventor/es:  
**DEBRIE, ROGER**

74 Agente/Representante:  
**Dávila Baz, Ángel**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE MEZCLAS DE POLISACÁRIDOS DE BAJOS PESOS MOLECULARES**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de mezclas de polisacáridos de bajos pesos moleculares, sulfatados y que presentan la estructura general de los polisacáridos que constituye la heparina. Comprende salificar, en medio acuoso, una heparina por medio de una sal de amonio cuaternario de cadena larga; esterificar la sal así obtenida para formar un éster que tiene un grado de esterificación comprendido entre el 9,5 y el 14%; y despolimerizar dicho éster.

Los polisacáridos resultantes tienen aplicación en la profilaxis y tratamiento de accidentes trombóticos.

ES 2 036 922 B9

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

La presente invención se refiere al campo de los polisacáridos de bajos pesos moleculares. Más particularmente la invención se refiere al campo de las heparinas de bajo peso molecular.

Las heparinas son sustancias biológicas de extracción de la familia de los glicosaminoglicanos, utilizadas por sus propiedades anticoagulante y antitrombótica. Principalmente, se utilizan en el tratamiento de las trombosis venosas post-operatorias. Sin embargo, en su forma nativa, las heparinas presentan un cierto número de inconvenientes que limitan las condiciones de su utilización. En particular, la actividad anticoagulante puede ocasionar hemorragias, y la sensibilidad a ciertos factores séricos, tal p<sub>f4</sub>, impone la utilización de dosis relativamente importantes. Por lo tanto es necesario privilegiar la actividad antitrombótica, atribuida principalmente a la actividad antiprotrombinasa, a expensas de la actividad anticoagulante, atribuida al efecto antitrombina.

Con este fin, se ha propuesto fragmentar las heparinas en moléculas de pesos moleculares medios menores. En particular, se conoce en el arte anterior la patente europea EP 40144. Esta patente describe mezclas de polisacáridos sulfatados que tienen una estructura general de los polisacáridos constituyentes de la heparina, que poseen el doble enlace etilénico en una de las extremidades de su cadena, y cuyo peso molecular medio en peso está comprendido entre 2000 y 10000 Daltons. Estas mezclas se obtienen por despolimerización y saponificación de un ester de heparina. Se ha indicado que presentan una actividad antitrombótica elevada y una actividad anticoagulante global inferior a la de la heparina.

Sin embargo, uno de los mayores problemas que se encuentran con las heparinas reside en el hecho de que se trata de productos muy heterogéneos. Por lo tanto es difícil apreciar la contribución de cada una de las especies en la actividad de la heparina, conocer el comportamiento de estas especies durante la despolimerización y finalmente controlar la estructura de estas especies y sus proporciones respectivas en los productos finales. Por estas razones, los inconvenientes anteriormente mencionados no han podido ser resueltos de manera totalmente satisfactoria. Principalmente, los procedimientos descritos en el arte anterior, y en particular en la patente EP 40144 no permiten obtener mezclas que poseen las propiedades farmacológicas requeridas para una mejor aplicación, a saber una semi-vida plasmática suficientemente elevada, una velocidad de absorción bastante grande, una fuerte biodisponibilidad y también una pequeña "anchura".

Por lo tanto se han descrito otros procedimientos que permiten fragmentar la heparina, con vistas a disminuir sus efectos indeseables (Johnson et coll. *Thrombos. Haemostas. Stuttg.*, 1.976, 35, 586; Lane et coll. *Thrombosis Research* 16, 651, Lasker et coll. US. 3.766.167). Cada uno de estos procedimientos parece indicar que la actividad buscada está privilegiada cuando el grado de fragmentación de la heparina aumenta (véase también la solicitud de patente europea EP 301618 relativa

a pentasacáridos que poseen una actividad antitrombótica).

En el mismo sentido, estudios recientes sobre el mecanismo de acción de las heparinas en la formación de la trombina han puesto de manifiesto una influencia del peso molecular medio de las heparinas sobre su actividad in vitro (Béguin et coll., *Thromb. Haemost.*, 61, 30, 1989). Los autores indican que las heparinas de bajo peso molecular poseen sobre todo una actividad antiprotrombinasa y las heparinas de peso molecular más elevado, una actividad antitrombina.

Paralelamente, se ha propuesto igualmente fraccionar las heparinas con el fin de extraer mezclas de peso molecular medio homogéneo. Se conoce en particular la solicitud de patente europea EP 337327, que describe un procedimiento para la preparación de fragmentos de oligosacáridos derivados de la heparina, que permite obtener mezclas que tienen una dispersión molecular reducida. Según este procedimiento, se eliminan previamente las fracciones de peso molecular inferior a 3.000 Daltons, lo que conduce a eliminar el producto final de los fragmentos que contienen menos de 10 a 16 sacáridos, y las especies de peso molecular superior a 7000 Daltons. Según los inventores, este tratamiento, que tiene por objeto homogeneizar la mezcla final, permitiría disminuir la actividad anticoagulante, al mismo tiempo que se conservaría la actividad antitrombótica buscada.

Sin embargo, a despecho de estos trabajos, las mezclas obtenidas presentan siempre un efecto hemorrágico residual, o una actividad antitrombótica demasiado débil. Además, nada en el arte anterior permite determinar cuales son las propiedades que deben ser reunidas para obtener una actividad biológica óptima. Por otra parte la conclusión de los autores del artículo precitado es elocuente: "no sabemos cual es la combinación óptima de las propiedades de la heparina". La caracterización precisa de diferentes preparaciones y la correlación de estas propiedades con observaciones clínicas podría eventualmente aportar una respuesta".

Se ha encontrado ahora que es posible obtener heparinas que presentan propiedades ventajosas, principalmente para su utilización en la profilaxis y el tratamiento de los accidentes tromboticos. De manera inesperada, la solicitante ha encontrado en efecto que la presencia en el producto final, a la vez de especies de alto y de bajo peso molecular, confiere una mejor actividad al producto. Contrariamente a las indicaciones del arte anterior, parece pues preferible conservar en la mezcla final especies de peso molecular elevado, así como una cierta heterogeneidad.

El estudio farmacocinético de las mezclas de la invención muestra que éstas reúnen propiedades particularmente ventajosas.

En particular, las mezclas de la invención presentan un tiempo de semi-vida superior a los otros productos conocidos, e igualmente a la heparina madura. Por otra parte, con relación a esta última, es importante señalar que la semi-vida de las mezclas de la invención es independiente de la dosis inyectada. Esto es interesante puesto que el efecto producido es mucho más predecible que en el caso de la heparina.

Además, en el caso del hombre, las mezclas de la invención presentan una excelente biodisponibilidad, medida por la actividad anti Xa. Así, desde el 30% aproximadamente para la heparina, es de aproximadamente el 90 % para las mezclas de la invención. Esto es muy ventajoso puesto que permite reducir las dosis inyectadas y mejorar la potencialidad terapéutica.

Por otra parte, otra propiedad importante de las mezclas de la invención reside en su gran velocidad de absorción. Esta característica permite obtener una actividad biológica casi instantánea, y ofrece por lo tanto una mayor seguridad en el tratamiento, cubriendo rápidamente al paciente.

Otra característica de las mezclas según la invención es su pequeña "anchura" comparativamente a los otros productos y a la heparina madura. Merced a su estructura química, a su peso molecular o a su grado de sulfato, estas mezclas presentan en efecto una resistencia particular a la degradación (desulfatación, hidrólisis) y a la eliminación, que aumenta todavía más sus capacidades terapéuticas.

Igualmente, las preparaciones de la invención poseen un tiempo de residencia acrecentado con relación a la heparina de partida. Esta propiedad se traduce en una prolongación del tiempo durante el cual el producto permanece activo in vivo, y por lo tanto por una mejor eficacia terapéutica.

Además, estas preparaciones presentan también una sensibilidad reducida a los factores sédicos, que aumenta su duración de acción in vivo y permite utilizarlas a dosis pequeñas.

Estas propiedades particularmente ventajosas se obtienen controlando, en el curso del procedimiento de preparación, ciertas características estructurales de las especies en presencia, así como su distribución molecular. Las mezclas así obtenidas están en una relación favorable entre las fracciones de altos y de bajos pesos moleculares, que les confieren las propiedades antitrombóticas requeridas, con un efecto hemorrágico pequeño.

Estas características de la invención se expresan a la vez por el porcentaje de cadenas pesadas y de cadenas ligeras y por la relación entre el peso molecular medio en peso de las mezclas y su peso molecular medio en número, que refleja la dispersión molecular.

Un objeto de la presente invención reside por lo tanto en mezclas de polisacáridos sulfatados que presentan la estructura general de los polisacáridos constituyentes de la heparina, caracterizadas porque tienen un peso molecular medio en peso inferior al de la heparina, que contiene entre 9 y 20% de cadena de peso molecular inferior a 2000 Daltons y entre 5 y 20% de cadenas de peso molecular superior a 8000 Daltons, y en las que la relación en peso molecular medio en número está comprendida entre 1,3 y 1,6.

Por otra parte, el solicitante ha comprobado que es posible mejorar todavía más las propiedades de las mezclas disminuyendo su grado de impurezas. Principalmente, la mayor parte de las heparinas contienen contaminantes tales como los ácidos nucleicos, los polipéptidos, o diversos polisacáridos. Entre éstos, se pueden citar en particular las condroitinas sulfatos, el heparano o el

dermatano sulfato. Cada uno de estos contaminantes, ya sea por su peso molecular muy elevado, por los sustituyentes que porta o por su grado de sulfatación, es capaz de interferir durante la preparación del producto (en la despolimerización por ejemplo) para modificar la distribución molecular final, o directamente en la actividad, modificando las proporciones de cadenas activas principalmente. La solicitante ha puesto a punto ahora un procedimiento que permite eliminar estas impurezas y ha comprobado una mejora de las cualidades de las mezclas que han sufrido este tratamiento. El efecto de este pretratamiento puede medirse utilizando como impureza testigo el dermatano sulfato.

Un objeto más particular de la presente invención reside en mezclas de polisacáridos sulfatados que presentan las características enunciadas anteriormente, caracterizadas porque contienen menos de 2% de dermatano sulfato.

En un modo preferido, las mezclas de polisacáridos sulfatados según la invención poseen un peso molecular medio en peso comprendido entre aproximadamente 3500 Daltons y aproximadamente 5500 Daltons.

Siempre preferentemente, las cadenas de polisacáridos sulfatados que constituyen las mezclas según la invención tienen un ácido 2-Q-sulfo 4 enopiranosurónico en una de sus extremidades.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de mezclas de polisacáridos sulfatados que tienen un peso molecular medio en peso inferior al de la heparina, que contienen entre 9 y 20% de cadena de peso molecular inferior a 2000 Daltons y entre 5 y 20% de cadenas de peso molecular superior a 8000 Daltons y en las que la relación en peso molecular medio en peso/peso molecular medio en número está comprendida entre 1,3 y 1,6. El procedimiento de la invención se caracteriza porque se efectúan las etapas siguientes:

- en una primera etapa se salifica el medio acuoso una heparina por medio de una sal de amonio cuaternario de cadena larga,
- en una segunda etapa, se esterifica la sal así obtenida para formar un éster que tiene un grado de esterificación comprendido entre 9,5 y 14%, y
- en una tercera etapa, se despolimeriza el éster obtenido que tiene un grado de esterificación comprendido entre 9,5 y 14%.

La solicitante ha comprobado en efecto que se puede controlar el nivel de despolimerización, y por lo tanto las características moleculares del producto final jugando sobre el grado de esterificación de la sal de heparina de partida.

Según la invención, por lo tanto es posible obtener directamente y de manera reproducible mezclas de polisacáridos sulfatados que tienen las características indicadas anteriormente.

La heparina de partida utilizada en el procedimiento según la invención es preferentemente una heparina de cerdo y principalmente mucosa de cerdo. Se ha encontrado en efecto que según el origen de la heparina de partida, la actividad

de las mezclas obtenidas podía variar de manera substancial. Principalmente, cuando la heparina de partida es de origen bovino, se obtienen mezclas que tienen una actividad anticoagulante superior a la obtenida a partir de la heparina de mucosa intestinal de cerdo.

Además, en una variante particularmente ventajosa, el procedimiento de la invención comprende también una etapa previa de precipitación de la heparina de partida por medio de un alcohol. Este pretratamiento permite disminuir el grado de impurezas de tipo condroitina sulfato o heparano sulfato.

Un alcohol que da buenos resultados es, por ejemplo, el metanol.

El grado de pureza de la heparina sódica puede determinarse a continuación por cromatografía líquida de exclusión estérica.

Esta etapa preliminar permite principalmente preparar una heparina que tiene un grado de dermatano sulfato inferior al 2%.

Más precisamente, el salificado de la heparina se realiza de la manera siguiente.

La sal de la heparina puede obtenerse por acción de un exceso de sal correspondiente sobre una heparina sódica, en medio acuoso, a una temperatura próxima a 20°C. De una manera ventajosa, la sal de amonio cuaternario utilizada es preferentemente una sal de bencetonio tal como principalmente el cloruro de bencetonio, que puede hacerse reaccionar sobre la heparina sódica.

En lo que se refiere a la segunda etapa, se prefiere realizar la esterificación en las condiciones siguientes.

El éster parcial de la heparina en forma de sal cuyo grado de esterificación está comprendido entre 9,5 y 14%, puede obtenerse por esterificación de la sal de amonio cuaternario de cadena larga de la heparina en un disolvente orgánico clorado en presencia de un derivado del cloro. Además, la eficacia de la reacción queda aumentada controlando las proporciones de dos diferentes reactivos y la temperatura y el tiempo de reacción.

De una manera ventajosa, el éster parcial de la heparina es un éster aromático.

También preferentemente, el derivado del cloro es el cloruro de bencilo, y el disolvente clorado se elige entre el cloroformo o el cloruro de metileno.

Para obtener un grado de esterificación comprendido entre 9,5 y 14%, puede ser particularmente ventajoso utilizar, por una parte en peso de sal de heparina, aproximadamente 1 parte en volumen de derivado del cloro en el seno de 3 a 5 partes en volumen de disolvente orgánico clorado, y efectuar la reacción durante un periodo de 15 a 48 horas, a una temperatura comprendida entre 25 y 45°C y preferentemente entre 30 y 40°C.

En un modo preferido de realización, el éster parcial de la heparina está en forma de una sal de sodio.

Los ésteres así formados pueden recuperarse por precipitación por medio de un alcohol tal como principalmente el metanol, en presencia de acetato de sodio. Preferentemente, se utilizan entre 1 y 1,2 volúmenes de alcohol por volumen de medio reaccional. El grado de esterificación del éster puede controlarse a continuación por cro-

matografía en fase líquida de alta resolución. En particular, en el caso del éster bencílico, se puede medir la cantidad de alcohol bencílico obtenido por saponificación del éster a 0°C.

La última etapa del procedimiento de la invención se conduce ventajosamente de la manera siguiente.

Preferentemente, la despolimerización se realiza tratando el éster con una base fuerte en solución acuosa. Más precisamente, se puede utilizar el carbonato sódico.

Ventajosamente, la relación en peso base/éster está comprendida entre 0,05 y 0,2, y preferentemente entre 0,08 y 0,15.

La temperatura del medio se ajusta a un valor comprendido entre 50 y 70°C, y preferentemente entre 55 y 65°C, y la relación se efectúa durante un periodo que va de 30 minutos a 3 horas, y preferentemente, de 1 a 2 horas.

Además, es preferible operar en un medio en el que la relación en peso agua/éster esté comprendida entre 15 y 30.

Una manera particularmente ventajosa de realizar la despolimerización consiste en mezclar:

- una parte en peso de un éster aromático de la heparina tal como se obtiene de la segunda etapa en forma de sal, cuyo grado de esterificación está comprendido entre 9,5 y 14%,
- entre 0,08 y 0,15 partes en peso de carbonato sódico, y
- entre 20 y 30 partes en peso de agua,

a continuación mantener durante 1 a 2 horas la temperatura entre 55 y 65°C.

El producto puede recuperarse a continuación por neutralización del medio reaccional por medio de un ácido mineral diluido, y preferentemente de ácido clorhídrico, y precipitación en presencia de un alcohol, tal como metanol.

De esta manera, es posible obtener directamente y de forma reproducible una mezcla de polisacáridos sulfatados que contiene:

- entre 9 y 20 % de cadenas de peso molecular inferior a 2000 Daltons,
- entre 5 y 20 % de cadena de peso molecular superior a 8000 Daltons,

y que tiene un peso molecular medio comprendido entre 3500 y 5500 Daltons y una relación peso molecular medio en peso/peso molecular medio en número comprendida entre 1,3 y 1,6.

Las mezclas de la presente invención pueden utilizarse de manera ventajosa como agentes antitrombóticos.

En particular, son aplicables para la prevención de trombosis venosas en las situaciones de riesgo.

Esto es válido igualmente en las situaciones de riesgo prolongado. En particular, estas mezclas permiten por primera vez disminuir, a dosis fijas, los riesgos de accidentes trombóticos en la cirugía ortopédica. Este riesgo es del 70% en ausencia de cualquier tratamiento y aproximadamente el 25%

en presencia de heparina, se sitúa en los alrededores del 10% con las mezclas de la invención, incluso menos.

Igualmente, inyectada en las tubuladuras de un riñón artificial, estas mezclas pueden reducir las trombosis susceptibles de desarrollarse en las mismas. Esta última aplicación puede extenderse a la prevención de las trombosis en el material quirúrgico.

Otra utilización terapéutica ventajosa de las mezclas de la invención reside en la prevención de los accidentes trombóticos arteriales, y principalmente en el caso de infarto de miocardio.

Por otra parte, una aplicación particularmente interesante de las mezclas según la presente invención reside en la posibilidad de utilizar, para la prevención de las trombosis venosas en el caso de las enfermedades quirúrgicas, en régimen post-operatorio. Esta aplicación es completamente ventajosa puesto que permite evitar los riesgos de hemorragia durante la operación, y los problemas de tipo y de dosis de anestesia, que se ocasionan por una prevención en régimen pre-operatorio.

El conjunto de estas propiedades demuestra las potencialidades terapéuticas de las preparaciones de la invención.

Los ejemplos siguientes, que no tienen ningún carácter limitativo, ilustran la presente invención. *Técnicas de dosificado.*

Los pesos moleculares y las distribuciones de peso molecular de los productos se determinan por cromatografía líquida a elevada presión con dos columnas en serie, por ejemplo las comercializadas bajo la designación TSK G 3000SW (30x0,75 cm) y Lichrosorb 100 Diol 10u (25x0,75 cm), o TSK G 2000SW, acopladas con un detector refractométrico. El disolvente utilizado es un tampón fosfato 0,3M pH 7, y el caudal es de 0,7 ml/minuto. El sistema está calibrado con patrones preparados por fraccionamiento de la enoxaparina (PHARMUKA) por cromatografía de exclusión sobre agarosa-poliacrilamida (IBF), según la técnica descrita por BarrowCliffe et Coll., *Thromb. res.*, 12, 27-36 (1977-78) o D.A. Lane et Coll., *Thromb. res.*, 12, 2257-271 (1977-78). Los resultados están calculados por medio del dispositivo lógico GPC6 (Perkin Elmer).

En los ejemplos que siguen, la actividad anticoagulante global de las mezclas se mide por turbidimetría utilizando el primer calibre internacional de heparina de bajo peso molecular. La actividad anti factor Xa (antitrombótico) se mide por el método amidolítico sobre un substrato cromógeno descrito por Teien et Coll., *Thromb.res.*, 10, 399-410 (1977), utilizando el primer calibre internacional de heparina de bajo peso molecular.

Ejemplo 1.

Este ejemplo ilustra la etapa previa de tratamiento de la heparina sódica, que permite reducir el grado de impurezas de tipo condroitina sulfato y heparano sulfato.

Se agregan a 10 g de heparina comercial (sal de sodio) en solución en 100 ml de agua, que contienen 3 g de cloruro de sodio, 80 ml de metanol. Tras precipitación, el producto obtenido se filtra, se enjuaga y a continuación se seca. El grado de pureza de la heparina sódica así obtenida se mide

por cromatografía líquida de exclusión estérica, con dos columnas en serie, las comercializadas bajo la designación TSK 2000SW (60 x 0,75 cm) y TSK 3000SW (60 x 0,75 cm), acopladas con un detector UV regulado a 206 nm. La fase móvil utilizada es una solución acuosa de sulfato de sodio 0,5M que circula a un caudal de 1ml.mn<sup>-1</sup>. El ensayo se compara con una heparina testigo que contiene 2% de dermatano sulfato.

En las condiciones indicadas anteriormente, la heparina obtenida contiene menos de 2% de dermatano sulfato.

Ejemplo 2.

Este ejemplo ilustra la preparación de la sal de amonio cuaternario de la heparina.

Se agrega a una solución de 10 g de heparina de sodio según el ejemplo 1, que contiene menos del 2% de dermatano sulfato, en 100 ml de agua, una solución de 25 g de cloruro de bencetonio en 125 ml de agua. El producto obtenido a temperatura ambiente, se filtra a continuación, se lava con agua y a continuación se seca.

De manera idéntica, se prepara la sal de bencetonio de una heparina que no ha sido sometida al tratamiento del ejemplo 1.

Ejemplo 3.

Este ejemplo ilustra la preparación y las propiedades de las mezclas según la invención.

1. Esterificación.

Se agregan a una solución de 15 g de heparina de bencetonio, previamente tratado según el procedimiento del ejemplo 1, en 75 cm de cloruro de metileno, 15 ml de cloruro de bencilo. La solución se calienta a una temperatura de 35°C, que se mantiene durante 25 horas. Se agregan entonces 90 ml de una solución al 10% de acetato de sodio en metanol, se filtra y se lava con metanol y se seca. Se obtienen así 6,5 g de éter bencílico de heparina en forma de sal de sodio, cuyo grado de esterificación, determinado como se ha indicado anteriormente, es del 13,3%.

2. Despolimerización.

Se disuelven 10 g del éter bencílico de heparina obtenido anteriormente en forma de sal de sodio en 250 ml de agua. A esta solución calentada a 62°C se agregan 0,9 g de carbonato sódico. La temperatura se mantiene durante 1 hora y 30 minutos a 62°C. La mezcla reaccional se refrigera a continuación hacia 20°C y se neutraliza por adición de ácido clorhídrico diluido. Se ajusta entonces la concentración del medio reaccional al 10% en cloruro de sodio. El producto se precipita finalmente en 750 ml de metanol, se filtra y se seca. Se obtiene así una heparina que presenta las características estructurales siguientes:

- peso molecular medio en peso: 3900 Daltons

- distribución molecular:

. 20% de cadenas de peso molecular inferior a 2000 Daltons

. 5,5 % de cadenas de peso molecular superior a 8000 Daltons

- dispersión: d = 1,39

- actividad anti Xa: 106 UI

- actividad anticoagulante: 22,6 UI.

#### Ejemplo 4.

Se preparan de una manera similar, partiendo de ésteres que tienen un grado de esterificación comprendido entre 9,5 y 14%, soluciones de heparina despolimerizada que tienen las características estructurales siguientes:

- a) - peso molecular medio en peso: 4425 Daltons  
 - distribución molecular:  
   . 12,4 % de cadenas de peso molecular inferior a 2000 Daltons  
   . 9,3 % de cadenas de peso molecular superior a 8000 Daltons  
 - dispersión:  $d = 1,37$   
 - actividad anti Xa: 102 UI  
 - actividad anticoagulante: 33 UI.
- b) - Peso molecular medio en peso: 4579 Daltons  
 - distribución molecular:  
   . 11,2 % de cadenas de peso molecular inferior a 2000 Daltons  
   . 10,4 % de cadenas de peso molecular superior a 8000 Daltons  
 - dispersión:  $d = 1,37$   
 - actividad anti Xa: 104 UI  
 - actividad anticoagulante: 37 UI.
- c) - Peso molecular medio en peso: 4446 Daltons  
 - distribución molecular:  
   . 12,6 % de cadenas de peso molecular inferior a 2000 Daltons  
   . 9,5 % de cadenas de peso molecular superior a 8000 Daltons  
 - dispersión:  $d = 1,38$   
 - actividad anti Xa: 100 UI  
 - actividad anticoagulante: 32 UI.

#### Ejemplo 5.

Este ejemplo ilustra la preparación de una mezcla que no entra en las características de la invención.

##### 1. Esterificación.

Se agregan a una solución de 15 g de heparinato de bencetonio previamente tratada según el procedimiento del ejemplo 1, en 60 ml de cloruro de metileno, 12 ml de cloruro de bencilo. La solución se calienta a una temperatura de 28°C, que se mantiene durante 30 horas. Se agregan entonces 90 ml de una solución al 10% de acetato de sodio en metanol, se filtra, se lava con metanol y se seca. Se obtienen así 6,3 g de éster bencílico de heparina en forma de sal de sodio. El grado de esterificación de este producto determinado por medida, en cromatografía líquida de alta resolución, de la cantidad de alcohol bencílico liberada por saponificación del éster a 0°C, es del 9,2%.

##### 2. Despolimerización.

Se disuelven 10 g del éster bencílico de heparina obtenido anteriormente en forma de sal de sodio, en 200 ml de agua. A esta solución, calentada a 58°C, se agregan 1,1 g de carbonato sódico. La temperatura se mantiene durante 1 hora a 58°C. La mezcla reaccional se refrigera a continuación hacia 20°C y se neutraliza por adición de ácido clorhídrico diluido. Se ajusta entonces la concentración del medio reaccional al 10% en cloruro de sodio. El producto se precipita finalmente en 600 ml de metanol, se filtra y se seca. Se obtienen así una heparina que presenta las características estructurales siguientes:

- peso molecular medio: 5425 Daltons  
 - distribución molecular:  
   . 9,6 % de cadenas de peso molecular inferior a 2000 Daltons  
   . 19,5 % de cadenas de peso molecular superior a 8000 Daltons.  
 - dispersión:  $d = 1,44$   
 - actividad anti Xa: 122 UI  
 - actividad anticoagulante: 68,6 UI.

Estos resultados, que hacen aparecer una actividad anticoagulante elevada, demuestran la superioridad de las mezclas preparadas según la invención, y que poseen las características enunciadas.

#### Ejemplo 6.

Este ejemplo ilustra la ganancia de estabilidad in vivo de las mezclas de la invención, expresada por su semi-vida plasmática.

Un primer estudio farmacocinético se ha realizado sobre voluntarios que tienen entre 21 y 30 años. Se han practicado inyecciones subcutáneas de dosis que varían entre 20 y 80 mg/ml. En el transcurso del tiempo, se han tomado muestras (4,5 ml) y se han almacenado aproximadamente a 4°C. Las muestras se han centrifugado entonces durante 15 minutos a 23000 g y el plasma pobre en plaquetas se ha separado, y se ha coagulado antes del análisis. La semi-vida de las mezclas se determina a continuación por medida de la actividad anti ka. Los resultados obtenidos son los siguientes:

- Con las mezclas obtenidas en los ejemplos 3 y 4:  
   . dosis de 40 mg: en 75 % de los casos la semi vida es superior a 4 horas, y es incluso superior a 4 horas y media en aproximadamente el 45 % de los casos.  
   . dosis de 60 mg: en el 75 % de los casos, la semi vida es superior a 3,7 horas.  
 - en las condiciones de dosificado idénticas, la heparina intacta, inyectada por vía intravenosa posee una semi-vida de 0,6 horas aproximadamente.

- Cuando el producto se prepara según el procedimiento descrito en la patente europea 40144, la semi-vida es superior a 4 horas y media en el 17 % de los casos.

Un segundo estudio realizado en condiciones similares sobre 20 pacientes ha dado los resultados siguientes para las mezclas según la presente invención:

- . dosis de 40 mg: en el 80% de los casos, la semi vida es superior a 4 horas, y es supe-

rior a 4 horas y media en el 40% aproximadamente de los casos.

- . dosis de 20 mg: en el 60% de los casos, la semi vida es superior a 3,9 horas.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

**REIVINDICACIONES**

1. Una mezcla de polisacáridos sulfatados que poseen la estructura general de los polisacáridos de los que se compone la heparina, teniendo dichos polisacáridos un peso molecular medio ponderal menor que el de la heparina y conteniendo entre 9 y 20% de cadenas de peso molecular inferior a 2.000 daltons y entre 5 y 20% de cadenas de peso molecular superior a 8.000 daltons, y en la que la relación de peso molecular medio ponderal/peso molecular medio en número está comprendida entre 1,3 y 1,6.

2. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene impurezas equivalentes a menos de 2% de dermatán sulfato.

3. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que posee un peso molecular medio ponderal comprendido entre aproximadamente 3.500 daltons y aproximadamente 5.500 daltons.

4. La mezcla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las cadenas de polisacáridos sulfatados tienen un ácido 2-O-sulfo-4-enopiranosurónico en uno de sus extremos.

5. Un proceso para preparar una mezcla de polisacáridos sulfatados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las siguientes etapas:

- en una primera etapa, convertir heparina en un medio acuoso en una sal de amonio cuaternaria de cadena larga de la misma,

- en una segunda etapa, esterificar la sal obtenida para formar un éster que tiene un grado de esterificación comprendido entre 9,5% y 14%, y

- en una tercera etapa, despolimerizar el éster obtenido que tiene un grado de esterificación comprendido entre 9,5 y 14%.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la segunda etapa se realiza en un disolvente orgánico clorado con un cloruro correspondiente al alcohol de esterificación.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cloruro es cloruro de benzofilo y el disolvente es cloroformo o cloruro de metileno.

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que la esterificación se realiza mezclando

1 parte en peso de la sal de heparina con aproximadamente 1 parte en volumen de un cloruro en 3 a 5 partes en volumen del disolvente orgánico clorado a una temperatura comprendida entre 25 y 45°C.

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la temperatura está comprendida entre 30 y 40°C.

10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la despolimerización se realiza por tratamiento del éster con una base fuerte en solución acuosa.

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la relación de pesos de base/éster está comprendida entre 0,05 y 0,2.

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la relación de pesos está comprendida entre 0,08 y 0,15.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, 11 ó 12, en el que la relación de pesos de agua/éster está comprendida entre 15 y 30.

14. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que la temperatura del medio se ajusta a un valor comprendido entre 50 y 70°C, y la reacción se realiza durante un periodo que varía de 30 minutos a 3 horas.

15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la temperatura del medio está comprendida entre 55°C y 65°C y la reacción se realiza durante 1 a 2 horas.

16. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, en el que el material de partida de heparina se ha purificado por precipitación en una solución acuosa con un alcohol.

17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, sustancialmente como se describe en los ejemplos anteriores 1 a 4.

18. Una mezcla de polisacáridos sulfatados obtenidos por el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 17.

19. El uso de una mezcla de polisacáridos sulfatados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 18 para la preparación de una composición terapéutica.





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ① ES 2 036 922  
② N.º solicitud: 9101505  
③ Fecha de presentación de la solicitud: 25.06.91  
④ Fecha de prioridad: 26.06.90

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: C08B 37/10 // A61K 31/725

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FR-A-2548672 (PHARMUKA LABORATOIRES) * Pág. 4, lín. 12-33; pág. 5, lín. 1-20 *	1,5,6,8
X	ES-A-8206555 (PHARMINDUSTRIE) * Pág. 11-15, ejemplo 3 *	1,5,6,8
A	ES-A-2006891 (BIOIBERICA, S.A.)	1
A	THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 61, n.º 1, pág. 30-34, 1989 Stuttgart, Alemania; S. BEGUIN et al.: "The mode of action of low molecular weight heparin preparation (PK10169) and two of its major components on thrombin generation in plasma".	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
29.05.92

Examinador  
I. Seriñá Ramírez

Página  
1/1