

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 232**

51 Int. Cl.:  
**C08B 37/00** (2006.01)  
**C08B 37/10** (2006.01)  
**A61K 31/726** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01271394 .7**  
96 Fecha de presentación: **17.12.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1358215**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2003**

54 Título: **GLICOSAMINOGLICANOS DERIVADOS DEL POLISACÁRIDO K5 QUE TIENEN ALTA ACTIVIDAD ANTITROMBINA Y PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN.**

30 Prioridad:  
**18.12.2000 US 738879**  
**12.09.2001 US 950003**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.12.2011**

73 Titular/es:  
**Glycores 2000 srl**  
**Via Mac Mahon, 43**  
**20155 Milan, IT**

72 Inventor/es:  
**Oreste Pasqua y**  
**Zoppetti Giorgio**

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 371 232 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Glicosaminoglicanos derivados del polisacárido K5 que tienen alta actividad antitrombina y procedimiento para su preparación.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los glicosaminoglicanos, tales como heparina, heparán sulfato, dermatán sulfato, condroitín sulfato y ácido hialurónico, son biopolímeros extraídos industrialmente de diferentes órganos de animales.

En particular, la heparina, obtenida principalmente mediante extracción de la mucosa intestinal de cerdo o pulmón bovino, es una mezcla de cadenas que consiste en unidades de repetición de disacárido formadas por un ácido urónico (ácido L-idurónico o ácido D-glucurónico) y por un aminoazúcar (glucosamina), unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 o  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4. La unidad de ácido urónico puede sulfatarse en la posición 2 y la unidad de glucosamina se somete a N-acetilación o N-sulfatación y 6-O-sulfatación. Además, la glucosamina puede contener un grupo sulfato en la posición 3 en una cantidad de aproximadamente el 0,5%. La heparina es un copolímero polidisperso con un peso molecular que oscila entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 30.000 D.

La biosíntesis natural de heparina en mamíferos y las propiedades de este producto se han descrito por Lindahl *et al.* 1986 en Lane D. y Lindahl U. (Eds.) "Heparin-Chemical and Biological Properties; Clinical Application", Edward Arnold. Londres, espacio entre páginas 159-190; y Lindahl U., Feingold, D.S. y Rodén L. (1986) TIBS, 11, 221-225.

La secuencia formada por la región de pentasacárido de unión para antitrombina III (ATIII) denominada pentasacárido activo, que es la estructura necesaria para la unión de alta afinidad de la heparina a ATIII, es fundamental para la actividad de la heparina. Esta secuencia contiene una unidad de glucosamina sulfatada en la posición 3, que no está presente en las otras partes de la cadena de heparina. Además de la actividad a través de ATIII, la heparina ejerce su actividad anticoagulante y antitrombótica a través la activación del cofactor II de heparina (HCII) y una inhibición de trombina selectiva. Se sabe que la secuencia de sacáridos mínima necesaria para la activación de HCII es una cadena que contiene al menos 24 monosacáridos (Tollefsen D.M., 1990 Seminars in Thrombosis and Haemostasis 16, 66-70).

## DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Se sabe que el polisacárido K5 capsular aislado de la cepa de *Escherichia coli*, descrito por Varm W.F., Schmidt MA, Jann B., Jann K. (1981) en European Journal of Biochemistry 116, 359-364, muestra la misma secuencia de heparina y precursor de heparán sulfato (N-acetilheparosano), concretamente una mezcla de cadenas constituida por estructuras de repetición del disacárido glucuronil  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-glucosamina. Este compuesto se modificó químicamente tal como se describe por Lormeau *et al.* en la patente estadounidense n.º 5.550.116 finalizada por Casu *et al.* en Carbohydrate Research. 1994, 263, 271-284 o se modificó química y enzimáticamente con el fin de obtener productos que muestran actividades biológicas *in vitro* en la coagulación del mismo tipo de la heparina tal como se extrae de órganos de animales.

La modificación química y enzimática del polisacárido K5 se describió por primera vez en el documento IT 1230785, en el que el polisacárido K5 (a continuación en el presente documento denominado también simplemente "K5") se somete a (a) una N-desacetilación y una N-sulfatación; (b) una epimerización en C5 enzimática de las unidades glucurónicas; (c) una 2-O y/o 6-O-sulfatación; y (d) una 3-O-sulfatación enzimática opcional, pero este método no proporciona productos que tienen una actividad satisfactoria con respecto a la de la heparina tal como se extrae de órganos de animales, denominada a continuación en el presente documento "heparina comercial" o "heparina convencional", designando la última expresión la cuarta norma internacional para heparina.

El documento WO 92/17507 da a conocer un método para preparar productos similares a heparina partiendo de K5 mediante (a) N-desacetilación y N-sulfatación, (b) epimerización en C5, y (c) O-sulfatación, siendo la etapa (c) opcionalmente seguida por una N-resulfatación. Según este método, la cantidad del ácido idurónico del producto resultante es bajo (aproximadamente el 20% del contenido global en ácidos urónicos).

Los documentos WO 96/14425 y US 5.958.899 dan a conocer un método mejorado para la preparación de productos similares a heparina que tienen un alto contenido en ácido idurónico, partiendo de K5, mediante (a) N-desacetilación y N-sulfatación, (b) epimerización mediante una C5 epimerasa, y (c) sulfatación de al menos algunos grupos hidroxilo libres, realizándose la etapa (b) en condiciones controladas. Los productos obtenidos según este método carecen de una cantidad considerable de grupos N-sulfato, perdidos durante la O-sulfatación.

Los documentos WO 97/43317 y US 6.162.797 dan a conocer derivados de K5 que tienen alta actividad anticoagulante que se preparan sometiendo K5 a (a) N-desacetilación y N-sulfatación, (b) epimerización en C5, (c) O-sobresulfatación del producto epimerizado, transformado previamente en una sal del mismo con una base orgánica, y diálisis, y (d) N-resulfatación. Los productos obtenidos según este método muestran una muy alta actividad anticoagulante global.

El documento WO 98/42754 da a conocer un método para la preparación de glicosaminoglicanos, incluyendo derivados de K5, que tienen alta actividad antitrombótica, consistiendo dicho método, en el caso de K5, en (a) N-desacetilación y N-sulfatación, (b) epimerización mediante C5 epimerasa, (c) O-sobresulfatación, (d) O-desulfatación solvolítica parcial de una sal del producto sobresulfatado, (e) N-resulfatación, y, opcionalmente, (f) O-resulfatación. Se esperaba que esta 6-O-resulfatación opcional, que reestablece la 6-O-sulfatación completa, aumentase adicionalmente la actividad anti-Xa (A. Naggi *et al.*, *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, 2001, 27/5, 437-443). En realidad, los productos obtenidos según este método tienen la desventaja de carecer o bien de grupos O-sulfato cuando no se realiza la etapa (f) de O-resulfatación opcional, o bien de grupos N-sulfato, que se pierden cuando se realiza la etapa (f). Por tanto, la N- u O-, especialmente la 6-O-sulfatación incompleta (siempre inferior al 60%) implica, en el caso del polisacárido K5 epimerizado en C5, valores de anti-Xa muy bajos, dando así una razón anti-Xa/TTPa muy baja en el caso de N-sulfatación incompleta, o antitrombina o HCII bajos en el caso de 6-O-sulfatación incompleta, dando así razones anti-Ila/TTPa y/o HCII/TTPa bajas.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

Se han descubierto nuevos glicosaminoglicanos derivados del polisacárido K5 de *Escherichia coli* con un peso molecular de desde 3.000 hasta 30.000, que contienen desde el 25% hasta el 50% en peso de las cadenas con alta afinidad por ATIII y con una alta actividad anticoagulante y antitrombótica.

Dichos glicosaminoglicanos se sintetizan a través de un procedimiento que comprende en secuencia sustancialmente las siguientes etapas: (i) N-desacetilación/N-sulfatación del polisacárido K5, (ii) epimerización en C5 parcial del grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico para dar el resto de ácido idurónico correspondiente, (iii) sobresulfatación, (iv) O-desulfatación selectiva, (v) 6-O-sulfatación selectiva opcional, y (vi) N-sulfatación.

Además, se ha encontrado que, llevando a cabo la O-desulfatación del producto obtenido al final de la etapa (iii) durante un periodo de tiempo de desde 135 hasta 165 minutos, se obtienen nuevos compuestos que muestran la mejor actividad antitrombótica y una hemorragia potencial inferior a la de cualquier otro glicosaminoglicano similar a heparina.

Se ha encontrado particularmente que pueden obtenerse nuevos glicosaminoglicanos que tienen una actividad antitrombina muy alta y una hemorragia potencial inferior a la de heparina mediante un procedimiento que comprende secuencialmente (i) N-desacetilación/N-sulfatación del polisacárido K5, (ii) epimerización en C5 parcial del grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico para dar el resto de ácido idurónico correspondiente, (iii) sobresulfatación, (iv) tiempo y temperatura controlados, O-desulfatación selectiva, (v) 6-O-sulfatación, (vi) N-sulfatación, y también comprende una etapa de despolimerización opcional al final de una de las etapas (ii)-(vi). Debido a esta secuencia de reacciones, estos glicosaminoglicanos novedosos están casi completamente N-sulfatados y altamente 6-O-sulfatados, siendo por tanto diferentes de los obtenidos mediante los métodos descritos previamente.

Más particularmente, se ha encontrado sorprendentemente que, si en la etapa (iv) del procedimiento anterior la O-desulfatación selectiva del producto obtenido al final de la etapa (iii) se lleva a cabo en una mezcla de dimetilsulfóxido/metanol durante un periodo de tiempo de desde 135 hasta 165 minutos a una temperatura de 50-70°C, se obtienen nuevos glicosaminoglicanos del tipo heparina, teniendo dichos glicosaminoglicanos una actividad anti-Xa al menos del mismo orden que la de la heparina convencional y una actividad anticoagulante global, expresada por ejemplo tal como TTPa, inferior a la de la heparina convencional, una actividad del cofactor II de heparina (HCII) al menos tan alta como la de la heparina convencional y una actividad anti-Ila (antitrombina) mucho más alta que la de la heparina convencional, teniendo también dichos glicosaminoglicanos novedosos un riesgo de hemorragia reducido con respecto a la heparina comercial. Además, se ha encontrado que llevando a cabo la etapa (iv) en las condiciones ilustradas anteriormente, se mantiene la actividad biológica con bajo riesgo de hemorragia del compuesto obtenido al final de la etapa (vi) tras la despolimerización, expresándose dicha actividad del producto despolimerizado por una actividad antitrombina muy alta, actividades anti-Xa y HCII del mismo orden que el de la heparina convencional y una actividad anticoagulante global inferior a la de la heparina convencional. Por tanto, llevando a cabo la etapa (iv) en estas condiciones controladas, es posible superar las desventajas mencionadas anteriormente de los procedimientos conocidos y obtener nuevos glicosaminoglicanos, que tienen actividad antitrombina selectiva y mejorada, útiles como agentes antitrombóticos y de control de la coagulación específicos.

A continuación en el presente documento, los derivados del polisacárido K5 se denominan también "K5 desacetilados" para el polisacárido K5 N-desacetilado, "K5-N-sulfato" para el polisacárido K5 N-desacetilado, N-sulfatado, "K5-N-sulfato epimerizado en C5" para el polisacárido K5 N-desacetilado, N-sulfatado, epimerizado en C5, "K5 N,O-sulfato epimerizado en C5," para K5 N-desacetilado, N,O sulfatado epimerizado en C5, tal como se obtiene al final de la etapa (vi) anterior, con o sin despolimerización. A menos que se especifique lo contrario, K5 de partida y sus derivados se pretenden en forma de sus sales de sodio.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del patrón de trabajo del polisacárido K5 obtenido según Vann W.F. *et al.* 1981 *European Journal of Biochemistry* 116, 359-364, repitiendo la purificación hasta casi la completa desaparición de los picos en la región de 4,9 a 52 ppm del espectro de <sup>1</sup>H-RMN.

La figura 2 muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del polisacárido K5 de partida del ejemplo 1.

La figura 3 muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del polisacárido K5 purificado usado como material de partida en la muestra 1 (i).

La figura 4 muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del polisacárido K5-N-sulfato obtenido en el ejemplo 1 (i).

La figura 5 muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la eficacia de la epimerasa C-5 inmovilizada en el ejemplo 1 (ii-1).

La figura 6 muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto epimerizado obtenido al final del ejemplo 1 (ii).

La figura 7 muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto sobresulfatado obtenido en el ejemplo 1 (iii).

La figura 8 muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto desulfatado obtenido en el ejemplo 1 (iv).

La figura 9 muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto obtenido en el ejemplo 1 (vi).

La figura 10 muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto de bajo peso molecular obtenido en el ejemplo 2.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de glicosaminoglicanos K5 que comprende las etapas de (i) N-desacetilación/N-sulfatación del polisacárido K5, (ii) epimerización en C5 parcial del grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico para dar el resto de ácido idurónico correspondiente, (iii) sobresulfatación, (iv) O-desulfatación selectiva, (v) 6-O-sulfatación selectiva opcional, y (vi) N-sulfatación, en el que la etapa (iv) comprende tratar el producto sobresulfatado obtenido al final de la etapa (iii) con una mezcla de metanol/dimetilsulfóxido durante un periodo de tiempo de desde 135 hasta 165 minutos.

Preferiblemente, dicho periodo de tiempo es de aproximadamente 150 minutos

El producto de la presente invención obtenido desde la etapa (ii) hasta la etapa (vi) puede despolimerizarse químicamente tal como se describe en el documento WO 82/03627, preferiblemente tras la etapa (vi).

Según una realización preferida, el tratamiento del producto sobresulfatado obtenido al final de la etapa (iii) con una mezcla de metanol/dimetilsulfóxido se realiza durante un periodo de tiempo de aproximadamente 150 minutos a una temperatura de aproximadamente 60°C.

Según este método ventajoso, a partir de los productos sobresulfatados preparados según las etapas (i) - (iii) se obtienen nuevos glicosaminoglicanos que muestran la mejor actividad antitrombótica y una hemorragia potencial inferior a la de cualquier otro glicosaminoglicano similar a heparina.

Se obtienen glicosaminoglicanos K5 particularmente interesantes según este método ventajoso sí, además, la epimerización parcial de la etapa (ii) proporciona al menos el 40% del resto de ácido idurónico, la sobresulfatación de la etapa (iii) se lleva a cabo en un disolvente aprótico a una temperatura de 40-60°C durante 10-20 horas y la etapa (v) de 6-O-sulfatación selectiva se realiza realmente.

Por tanto, es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para la preparación de glicosaminoglicanos novedosos, que comprende

(i) hacer reaccionar el polisacárido K5 con un agente N-desacetilado, luego tratar el producto N-desacetilado con un agente de N-sulfatación;

(ii) someter el K5-N-sulfato así obtenido a una epimerización en C5 mediante la glucuronosil C5 epimerasa para obtener un K5-N-sulfato epimerizado en C5 en el que la razón glucurónico/idurónico es desde 60/40 hasta 40/60;

(iii) convertir el K5-N-sulfato epimerizado en C5, que tiene un contenido del 40 al 60% en ácido idurónico con respecto a los ácidos urónicos totales, en una sal terciaria o cuaternaria del mismo, luego tratar la sal así obtenida con un agente de O-sulfatación en un disolvente polar aprótico a una temperatura de 40-60°C durante 10-20 horas;

(iv) tratar una sal con una base orgánica del producto O-sobresulfatado así obtenido con una mezcla de dimetilsulfóxido/metanol a 50-70°C durante 135-165 minutos;

(v) tratar una sal con una base orgánica del producto parcialmente O-desulfatado así obtenido con un agente de O-sulfatación a una temperatura de 0-5°C;

(vi) tratar el producto así obtenido con un agente de N-sulfatación; sometiéndose opcionalmente cualquier producto obtenido al final de una de las etapas (ii) a (vi) a una despolimerización.

5 K5 usado como material de partida puede ser cualquier producto tal como se obtiene mediante la fermentación de cepas de *Escherichia coli* naturales o clonadas que producen K5. En particular, puede emplearse uno de los K5 mencionados anteriormente, ventajosamente uno de los ilustrados por M. Manzoni *et al.* Journal Bioactive Compatible Polymers, 1996, 11, 301-311 o en el documento WO 01/02597, preferiblemente purificados previamente.

10 Los materiales de partida K5 ventajosos tienen un bajo peso molecular, particularmente con una distribución de desde aproximadamente 1.500 hasta aproximadamente 15.000, ventajosamente desde aproximadamente 2.000 hasta aproximadamente 9.000 con un peso molecular medio de aproximadamente 5.000, o un peso molecular superior, particularmente con una distribución de desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 50.000, ventajosamente desde aproximadamente 20.000 hasta aproximadamente 40.000 con un peso molecular medio de aproximadamente 30.000. Preferiblemente, K5 de partida tiene una distribución de peso molecular de desde  
15 aproximadamente 1.500 hasta aproximadamente 50.000, con un peso molecular medio de 20.000-25.000. Todos los pesos moleculares se expresan en Dalton (D). Se pretende que el peso molecular de K5 y de sus derivados descritos a continuación en el presente documento sea tal como se calcula usando fracciones de heparina que tienen un peso molecular conocido como patrones.

20 Normalmente, para la preparación del polisacárido K5 de *Escherichia coli*, primero se realiza una fermentación en matraz según la solicitud de patente italiana MI99A001465 (documento WO 01/02597) y usando el siguiente medio:

Soja desgrasada	2	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,7	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	g/l
MgCl <sub>2</sub>	0,11	g/l
Citrato de sodio	1	g/l
Sulfato de amonio	1	g/l
Glucosa	2	g/l
Agua	1.000	ml
pH 7,3		

25 Se esteriliza el medio a 120°C durante 20 minutos. Se prepara glucosa por separado como una disolución que se esteriliza a 120°C durante 30 minutos y se añade estéril al medio. Se inocula el matraz con una suspensión de células de *E. coli* Bi 8337/41 (O10:K5:H4) desde un agar inclinado que contiene tripticasa y soja y se incuba a 37°C durante 24 horas con agitación controlada (160 rpm, 6 cm de recorrido). Se mide el crecimiento bacteriano contando las células con un microscopio. En una etapa adicional, se inocula un fermentador Chemap-Braun con un volumen de 14 litros que contiene el mismo medio anterior con el 0,1% del cultivo del matraz anterior y se realiza la fermentación con aireación  
30 de 1 wm (wm = volumen de aire por volumen de líquido por minuto), 400 rpm de agitación y temperatura de 37°C durante 18 horas. Durante la fermentación se miden el pH, el oxígeno, la glucosa residual, el polisacárido K5 producido y el crecimiento bacteriano.

35 Al final de la fermentación, la temperatura se eleva hasta 80°C durante 10 minutos. Se separan las células del medio mediante centrifugación a 10.000 rpm y se ultrafiltra el sobrenadante a través de un módulo de SS 316 (MST) equipado con membranas de PES con un punto de corte nominal de 800 y 10.000 D para reducir el volumen hasta 1/5. Luego se precipita el polisacárido K5 añadiendo 4 volúmenes de acetona a 4°C y se deja sedimentar durante una noche a 4°C y finalmente se centrifuga a 10.000 rpm durante 20 minutos o se filtra.

40 Luego se realiza una desproteínización usando una proteasa del tipo II de *Aspergillus Orizae* en NaCl 0,1 M y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,15 M a pH 8 que contiene el 0,5% de dodecilsulfato de sodio (SDS) (10 mg/l de filtrado) a 37°C durante 90 minutos. Se ultrafiltra la disolución en un módulo de SS 316 con una membrana de punto de corte nominal de 10.000 D con 2 extracciones con NaCl 1 M y se lava con agua hasta que desaparezca la absorbancia en el ultrafiltrado. Luego se precipita el polisacárido K5 con acetona y se obtiene un rendimiento de 850 mg/l de  
45 fermentador. Se mide la pureza del polisacárido mediante determinación con ácido urónico (método de carbazol), RMN de protón y carbono, contenido en proteína y UV. La pureza es superior al 80%.

50 El polisacárido así obtenido está compuesto de dos fracciones con diferente peso molecular, 30.000 y 5.000 D respectivamente, tal como se obtiene a partir de la determinación por HPLC usando una columna 75 HR de Pharmacia y una única fracción con un tiempo de retención de aproximadamente 9 minutos usando dos columnas de Bio-sil SEC 250 en serie (BioRad) y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvil a temperatura ambiente y velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto. La determinación se realiza frente a una curva obtenida con fracciones de heparina con peso molecular conocido. La RMN de protón se muestra en la figura 2.

55 Tal polisacárido K5 puede usarse como material de partida para el procedimiento de la presente invención debido a que su pureza es suficiente para realizar dicho procedimiento. Ventajosamente, este material de partida se purifica previamente.

5 Se obtiene una purificación adecuada del polisacárido K5 mediante el tratamiento con Triton X-100. Normalmente, se añade Triton X-100 hasta obtener una disolución acuosa al 1% del polisacárido K5 anterior ya suficientemente puro, a una concentración del 5%. Se mantiene la disolución a 55°C durante 2 horas con agitación. La temperatura se eleva hasta 75°C y durante el enfriamiento hasta temperatura ambiente se forman dos fases. En la fase superior (fase orgánica) el tratamiento térmico con la formación de las dos fases, se repite dos veces. La fase acuosa que contiene el polisacárido finalmente se concentra a presión reducida y se precipita con etanol o acetona. Se deshecha la fase orgánica. La pureza de la muestra se controla mediante RMN de protón y resulta ser el 95%.

10 El rendimiento de este tratamiento es el 90%.

15 En la etapa (i), el K5 de partida se somete a una N-desacetilación y N-sulfatación posterior que se llevan a cabo mediante métodos conocidos *per se*. Normalmente, se disuelven 10 g de K5 purificado en 100-2.000 ml de hidróxido de sodio 2 N y se deja reaccionar a 40-80°C durante el tiempo necesario para lograr la N-desacetilación completa, que nunca es inferior a 30 horas. Se enfría la disolución hasta temperatura ambiente y el pH se lleva a neutralidad con ácido clorhídrico 6 N.

20 La disolución que contiene el K5 N-desacetilado se mantiene a 20-65°C y se añaden 10-40 g de carbonato de sodio junto con 10-40 g de un agente de sulfatación escogido de entre los reactivos disponibles tales como el producto de adición piridina.trióxido de azufre, trimetilamina.trióxido de azufre y similares. La adición del agente de sulfatación se realiza durante un tiempo variable hasta 12 horas. Al final de la reacción, la disolución se lleva hasta temperatura ambiente, si es necesario y hasta un pH de 7,5-8 con una disolución de ácido clorhídrico al 5%.

25 Se purifica el producto a partir de sales mediante tecnologías conocidas, por ejemplo mediante diafiltración usando una membrana espiral con 1.000 D de punto de corte (cartucho Prepscale - Millipore). El procedimiento culmina cuando la conductividad del permeado es inferior a 1.000  $\mu$ S, preferiblemente inferior a 100  $\mu$ S. El volumen del producto obtenido se concentra hasta una concentración del polisacárido del 10% usando el mismo sistema de filtración que el concentrador. Si es necesario, la disolución concentrada se seca con las tecnologías conocidas.

30 La razón N/sulfato/N-acetilo oscila entre 10/0 y 7/3 medida mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN.

35 La etapa (ii) de epimerización en C5 según la presente invención puede realizarse con la enzima glucuronosil C5 epimerasa (también denominada C5 epimerasa) en disolución o en su forma inmovilizada, en particular para dar al menos el 40% de epimerización, por ejemplo en presencia de cationes divalentes específicos, escogiéndose dicha enzima del grupo que incluye glucuronosil C5 epimerasa recombinante, glucuronosil C5 epimerasa de mastocitoma murino y glucuronosil C5 epimerasa extraída de hígado bovino y escogiéndose dichos cationes divalentes del grupo que comprende Ba, Ca, Mg y Mn, tal como se describe en el documento WO 01/72848. Normalmente, la epimerización se lleva a cabo de la siguiente forma.

40 - Epimerización en C5 con la enzima en disolución.

45 Se disuelven desde  $1,2 \times 10^7$  hasta  $1,2 \times 10^{11}$  cpm (cuentas por minuto) de C5 epimerasa natural o recombinante, calculada según el método descrito por Campbell P. *et al.* Analytical Biochemistry 131, 146-152 (1983), en 2-2.000 ml de tampón Hepes 25 mM a un pH comprendido entre 5,5 y 7,4, que contiene 0,001-10 g de K5-N-sulfato y uno o más de los iones escogidos de entre bario, calcio, magnesio, manganeso a una concentración que oscila entre 10 y 60 mM. La reacción se realiza a una temperatura que oscila entre 30 y 40°C, preferiblemente 37°C durante 1-24 horas. Al final de la reacción se inactiva la enzima a 100°C durante 10 minutos.

50 Se purifica el producto mediante el paso por una dietilaminoetil-resina (DEAE-resina) o un dispositivo de DEAE Sartobind y se separa con NaCl 2 M y finalmente se desala en una resina de Sephadex G-10 o se purifica mediante precipitación con 2 volúmenes de etanol y el paso por una resina IR 120 H<sup>+</sup> para preparar la sal de sodio.

55 El producto obtenido muestra una razón ácido idurónico/ácido glucurónico de entre 40:60 y 60:40 calculada mediante  $^1\text{H}$ -RMN tal como ya se describió en el documento WO 96/14425.

- Epimerización en C5 con enzima inmovilizada.

60 La enzima C5 epimerasa, natural o recombinante, puede inmovilizarse en diferentes soportes inertes incluyendo resinas, membranas o perlas de vidrio derivatizadas con grupos funcionales reactivos usando las tecnologías de unión más comunes para las enzimas tales como bromuro de cianógeno, glutaraldehído, carbodiimida o haciendo que reaccione la enzima con una resina de intercambio iónico o que se adsorba sobre una membrana. Según la presente invención, las reacciones de unión de la enzima con el soporte inerte se realizan en presencia del sustrato K5-N-sulfato para evitar que el sitio activo de la enzima se una con pérdida de actividad. La medición de la actividad de la enzima inmovilizada se realiza haciendo recircular la cantidad de K5-N-sulfato que teóricamente puede epimerizarse por dicha cantidad de cpm de enzima inmovilizada en una columna de la enzima inmovilizada en presencia de tampón Hepes 25 mM, KCl 0,1 M, Triton X-100 al 0,01% y EDTA 0,15 M, pH 7,4, a 37°C durante la noche a una velocidad de flujo de 0,5

ml/minuto. Tras la purificación mediante el método cromatográfico con DEAE y la desalación en Sephadex G-10, se liofiliza el producto y se calcula el contenido en ácido idurónico mediante RMN de protón.

La razón ácido idurónico/ácido glucurónico debería ser de aproximadamente 30/70.

Un volumen de 20-1.000 ml de tampón Hepes 25 mM a un pH de entre 6 y 7,4 que contiene uno o más iones escogidos de entre bario, calcio, magnesio, manganeso a una concentración de entre 10 y 60 mM y 0,001-10 g de K5-N-sulfato mantenido a una temperatura de entre 30 y 40°C, se recirculan a una velocidad de flujo de 30-160 ml/hora durante 1-24 horas en una columna que contiene desde  $1,2 \times 10^7$  hasta  $3 \times 10^{11}$  cpm equivalentes de la enzima inmovilizada en el soporte inerte mantenido a una temperatura desde 30 hasta 40°C. Al final de la reacción, se purifica la muestra con los mismos métodos indicados en la epimerización en disolución.

La razón ácido idurónico/ácido glucurónico del producto obtenido oscila entre 40:60 y 60:40.

Según una realización preferida, dicha epimerización en C5 se realiza con la enzima en su forma inmovilizada y comprende hacer recircular 20-1.000 ml de una disolución de Hepes 25 mM a pH desde 6 hasta 7,4 que contiene 0,001-10 g de K5-N-sulfato y uno de dichos cationes a una concentración de entre 10 y 60 mM a través de una columna que contiene desde  $1,2 \times 10^7$  hasta  $3 \times 10^{11}$  cpm de la enzima inmovilizada en un soporte inerte, siendo preferiblemente dicho pH aproximadamente 7 y realizándose preferiblemente dicha epimerización en C5 a una temperatura de aproximadamente 30°C haciendo recircular dicha disolución con una velocidad de flujo de aproximadamente 200 ml/hora durante un tiempo de aproximadamente 24 horas.

La etapa (iii), que consiste en una O-sobresulfatación, se lleva a cabo convirtiendo previamente el K5-N-sulfato epimerizado en C5 en una sal terciaria o cuaternaria del mismo y luego tratando dicha sal con un agente de O-sulfatación a una temperatura de 40-60°C durante 10-20 horas. Normalmente, se enfría la disolución que contiene el producto epimerizado de la etapa (ii) a una concentración del 10% a 10°C y se hace pasar a través de una columna IR 120 H<sup>+</sup> o equivalente (35-100 ml). Tanto la columna como el envase del producto se mantienen a 10°C. Tras el paso de la disolución, se lava la resina con agua desionizada hasta que el pH del flujo que pasa es superior a 6 (aproximadamente 3 volúmenes de agua desionizada). La disolución ácida se mantiene neutra con una amina terciaria o cuaternaria tal como hidróxido de tetrabutilamonio (disolución acuosa al 15%) obteniendo la sal de amonio del polisacárido. Se concentra la disolución hasta el volumen mínimo y se liofiliza. Se suspende el producto obtenido en 20-500 ml de dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfóxido (DMSO) y se le añaden 15-300 gr. de un agente de sulfatación tal como el producto de adición piridina.SO<sub>3</sub> en la forma sólida o en disolución de DMF o DMSO. La disolución se mantiene a 20-70°C durante 2-24 horas, preferiblemente a 40 - 60°C durante 15-20 horas. Al final de la reacción, se enfría la disolución hasta temperatura ambiente y se le añade acetona saturada con cloruro de sodio hasta precipitación completa. Se separa el precipitado del disolvente mediante filtración, se solubiliza en la mínima cantidad de agua desionizada (por ejemplo 100 ml) y se le añade cloruro de sodio para obtener una disolución 0,2 M. La disolución se lleva hasta pH 7,5-8 con hidróxido de sodio 2 N y se le añade acetona hasta precipitación completa. Se separa el precipitado del disolvente mediante filtración. Se disuelve el sólido obtenido en 100 ml de agua desionizada y se purifica de las sales residuales mediante ultrafiltración tal como se describe en la etapa (i).

Parte del producto obtenido se liofiliza para el análisis estructural del producto sobresulfatado mediante <sup>13</sup>C-RMN. El contenido en sulfatos por disacárido del producto obtenido es 2,8-3,5 calculado según Casu B. *et al.* Carbohydrate Research 1975, 39, 168-176. Se sulfata la posición 6 de la glucosamina al 80-95% y se desulfata completamente la posición 2. Los otros grupos sulfato están presentes en la posición 3 del aminoazúcar y en las posiciones 2 y 3 del ácido urónico.

La etapa (iv), que consiste en una O-desulfatación selectiva, es la etapa clave del procedimiento de la presente invención, porque permite la preparación, al final de la etapa (vi), de glicosaminoglicanos que, tras la despolimerización, dan productos de bajo peso molecular sustancialmente manteniendo una alta actividad antitrombina. Normalmente, la disolución que contiene el producto de la etapa (iii) se hace pasar a través de una resina de intercambio catiónico IR 120 H<sup>+</sup> o equivalente (35-100 ml). Tras el paso de la disolución, se lava la resina con agua desionizada hasta que el pH del flujo que pasa es superior a 6 (aproximadamente 3 volúmenes de agua desionizada). La disolución ácida se lleva a neutralidad con piridina. Se concentra la disolución hasta el volumen mínimo y se liofiliza. Se trata el producto obtenido con 20-2.000 ml de una disolución de DMSO/metanol (9/1 V/V) y la disolución se mantiene a 50-70°C durante 135-165 minutos, preferiblemente a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 150 minutos. Finalmente a la disolución se le añaden 10-200 ml de agua desionizada y se trata con acetona saturada con cloruro de sodio hasta precipitación completa.

Con la O-desulfatación selectiva, los grupos sulfato en la posición 6 de la glucosamina se eliminan primero, luego los grupos sulfato en las posiciones 3 y 2 del ácido urónico y finalmente el grupo sulfato en la posición 3 del aminoazúcar. El espectro de <sup>13</sup>C-RMN de la muestra obtenida (figura 8) muestra la N-desulfatación completa del residuo de glucosamina (señal a 56 ppm) y la casi 6-O-desulfatación completa con la disminución de la señal a 67,6 ppm y la aparición de la señal a 62,2 ppm. Las señales a 65 y 86 ppm muestran el ácido idurónico 2-O-sulfatado y el ácido glucurónico 3-O-sulfatado, respectivamente. Se purifica el sólido obtenido mediante diafiltración según métodos conocidos, por ejemplo usando una membrana espiral con 1.000 D de punto de corte (cartucho Prepscale - Millipore). El

procedimiento culmina cuando la conductividad del permeado es inferior a 1.000  $\mu$ S, preferiblemente inferior a 100  $\mu$ S. El volumen del producto obtenido se concentra hasta una concentración del polisacárido del 10% usando el mismo sistema de filtración que el concentrador. Si es necesario, se seca la disolución concentrada mediante tecnologías convencionales.

5 La etapa (v), que consiste en una 6-O-sulfatación, también debe llevarse a cabo si, tras una etapa de despolimerización tras la etapa (vi) anterior, se desean compuestos que tienen una alta actividad antitrombina, actividades anti-Xa, HCII tan altas como las de la heparina y una baja TTPa. La 6-O-sulfatación selectiva se lleva a cabo convirtiendo el producto O-desulfatado selectivo en una sal terciaria o cuaternaria del mismo y tratando dicha sal con un agente de O-sulfatación a temperatura baja, más particularmente a 0-5°C durante 0,5-3 horas. Normalmente, la 6-O-sulfatación se lleva a cabo tal como se ilustró anteriormente para la etapa (iii) de O-sulfatación. Se purifica el sólido obtenido mediante diafiltración tal como se describe en la etapa (iv). Se liofiliza una pequeña cantidad para el análisis estructural mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN. Si el contenido en grupos 6-O sulfato calculado mediante RMN, tal como se describe en Casu *et al.* Arzneimittel-Forschung Drug Research, 1983, 33, 135-142, es inferior a aproximadamente el 85%, se repite la etapa (v).

15 La etapa (vi) debe realizarse porque un porcentaje no despreciable de grupos N-sulfato se pierden durante la etapa de O-sobresulfatación. Por tanto, la disolución obtenida en la etapa (v) se trata tal como se describe en la etapa (i) para la N-sulfatación con el fin de aislar el K5 N,O-sulfato epimerizado en C5 de la invención.

20 Cualquier producto de alto peso molecular obtenido al final de una de las etapas (ii) a (vi) puede despolimerizarse químicamente con el fin de obtener, como productos finales, glicosaminoglicanos de bajo peso molecular que tienen alta actividad antitrombina, actividades anti-Xa y HCII del mismo orden de las de la heparina convencional y una actividad TTPa inferior a la de la heparina convencional.

25 Generalmente, el procedimiento de la presente invención se realiza llevando a cabo las etapas (i)-(vi) secuencialmente y sometiendo el K5 N,O-sulfato epimerizado en C5 de alto peso molecular obtenido al final de la etapa (vi) a despolimerización. Por supuesto, tal despolimerización no es necesaria para preparar un K5 N,O-sulfato epimerizado en C5 de bajo peso molecular si, como material de partida, se usa una fracción de K5 de bajo peso molecular, opcionalmente purificado previamente.

30 La despolimerización puede llevarse a cabo según los métodos conocidos para la despolimerización de heparina, por ejemplo mediante ácido nitroso y reducción posterior con borohidruro de sodio (documentos WO 82/03627 - EP 37319), mediante peryodato de sodio (documento EP 287477), mediante radicales libres (documento EP 121067) o mediante eliminación  $\beta$  (documento EP 40144), con el fin de obtener, como producto final, un glicosaminoglicano constituido por una mezcla de cadenas en el que al menos el 80% de dichas cadenas tienen una distribución de peso molecular que oscila entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 10.000 con un peso molecular medio de desde aproximadamente 4.000 hasta aproximadamente 8.000.

35 Los glicosaminoglicanos obtenidos mediante el procedimiento de la invención se caracterizan mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN de protón y carbono y mediante pruebas biológicas como anti-Xa, TTPa, HCII, Anti-IIa y afinidad por ATIII. Tal como ya se mencionó anteriormente, el grado de sulfatación, concretamente el número de grupos sulfato por unidad de disacárido expresado como razón sulfato/carboxilo ( $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$ ), se determina tal como se describe en Casu *et al.*, Carbohydrate Research, 1975, 39, 168-176.

45 El producto obtenido al final de la etapa (vi), sin ninguna despolimerización, también puede fraccionarse mediante cromatografía sobre resina o ultrafiltración para obtener fracciones de bajo peso molecular de desde 2.000 hasta 8.000 D y fracciones de alto peso molecular de desde 25.000 hasta 30.000 D.

50 Los glicosaminoglicanos K5 N,O-sulfato epimerizados en C5 novedosos obtenidos al final del procedimiento de la presente invención se aíslan generalmente en forma de sus sales de sodio. Dicha sal de sodio puede convertirse en otra sal. Dicha otra sal puede ser otra sal de metal alcalino o un metal alcalinotérreo, amonio, trialquil( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )amonio, aluminio o sal de zinc.

55 Los productos obtenidos mediante el procedimiento de la presente invención muestran actividad comparable a la heparina de extracción en la prueba de anti-Xa y actividad anticoagulante global reducida (método de TTPa) mientras que los valores de las pruebas que implican inhibición de trombina, cofactor II de heparina (HCII) y actividades anti-IIa, son del mismo orden que o notablemente más altos que los de la heparina convencional. Estas características del producto obtenido son predictivas de un mejor control de la coagulación y propiedades antitrombóticas y menores efectos secundarios, tales como efectos de hemorragia, que las de las heparinas comerciales y de otros glicosaminoglicanos anticoagulantes conocidos.

60 Así es un objeto adicional de la presente invención proporcionar glicosaminoglicanos K5 N,O-sulfato epimerizados en C5 novedosos que pueden obtenerse mediante un procedimiento que comprende

65 (i) hacer reaccionar K5 con un agente de N-desacetilación, luego tratar el producto N-desacetilado con un agente de N-sulfatación;



(ii) someter el K5-N-sulfato así obtenido a una epimerización en C5 mediante la glucuronosil C5 epimerasa para obtener un K5-N-sulfato epimerizado en C5 en el que la razón glucurónico/idurónico es desde 60/40 hasta 40/60;

5 (iii) convertir el K5-N-sulfato epimerizado en C5, que tiene un contenido del 40 al 60% en ácido idurónico con respecto a los ácidos urónicos totales, en una sal terciaria o cuaternaria del mismo, luego tratar la sal así obtenida con un agente de O-sulfatación en un disolvente polar aprótico a una temperatura de 40-60°C durante 10-20 horas;

10 (iv) tratar una sal con una base orgánica del producto O-sobresulfatado así obtenido con una mezcla de dimetilsulfóxido/metanol a 50-70°C durante 135-165 minutos;

(v) tratar una sal con una base orgánica del producto parcialmente O-desulfatado así obtenido con un agente de O-sulfatación a una temperatura de 0-5°C;

15 (vi) tratar el producto así obtenido con un agente de N-sulfatación; sometiéndose opcionalmente cualquier producto obtenido al final de una de las etapas (ii) a (vi) a una despolimerización y convirtiendo opcionalmente la sal de sodio del producto final en otra sal.

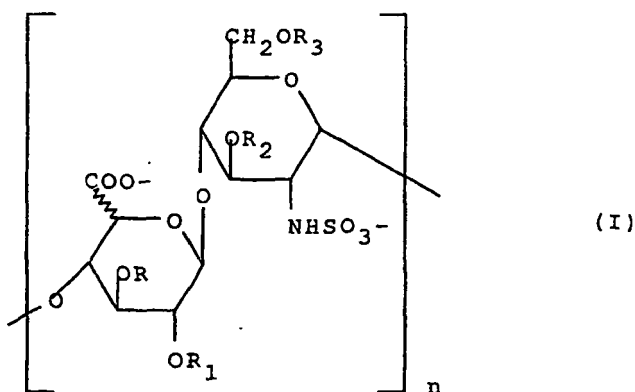
20 Glicosaminoglicanos K5 N,O-sulfato epimerizados en C5 particularmente ventajosos son los que pueden obtenerse mediante el procedimiento anterior, en el que la etapa (iv) se lleva a cabo en una mezcla de dimetilsulfóxido/metanol 9/1 (V/V) a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 150 minutos.

25 Una clase de glicosaminoglicanos preferidos derivados de K5 puede obtenerse mediante la realización de las etapas (i)-(vi) anteriores sobre un K5 purificado previamente, mediante lo cual la etapa (iv) se lleva a cabo calentando a aproximadamente 60°C en una mezcla dimetilsulfóxido/metanol 9/1 durante aproximadamente 150 minutos, y opcionalmente sometiéndolo el K5 N,O-sulfato epimerizado en C5 así obtenido a una despolimerización con ácido nitroso y a una reducción con borohidruro de sodio posterior.

30 Ventajosamente, dicha otra sal es otra sal de metal alcalino, metal alcalinotérreo, amonio, trialquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, aluminio o zinc.

Los glicosaminoglicanos K5 N,O-sulfato epimerizados en C5 que pueden obtenerse según el procedimiento que comprende las etapas (i)-(vi) anteriores, incluyendo la despolimerización opcional y la formación de una sal, tienen la estructura I tal como se ilustra a continuación en el presente documento.

35 Por tanto, es otro objeto de la presente invención proporcionar glicosaminoglicanos novedosos constituidos por una mezcla de cadenas en los que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I



40 en la que el 40-60% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico, n es un número entero desde 3 hasta 100, R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan un átomo de hidrógeno o un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y siendo desde aproximadamente el 65% hasta aproximadamente el 50% de R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> hidrógeno y siendo el resto grupos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> distribuidos de la siguiente forma

45 - R<sub>3</sub> es desde aproximadamente el 85% hasta aproximadamente el 95% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;

- R<sub>2</sub> es desde aproximadamente el 17 hasta aproximadamente el 21 % de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;

- R<sub>1</sub> es desde aproximadamente el 15 hasta aproximadamente el 35% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas y del 0 al 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas;

50 - R es desde aproximadamente el 20 hasta aproximadamente el 40% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas y del 0 al 5% en unidades idurónicas;

- la suma del porcentaje de  $\text{SO}_3^-$  en  $\text{R}_1$ , unidades glucurónicas, y en R, unidades idurónicas, es desde el 3 hasta el 7%;

5 no siendo  $\text{R}_1$  y R simultáneamente  $\text{SO}_3^-$  y siendo ambos hidrógeno en el 25-45% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación desde aproximadamente 2,3 hasta aproximadamente 2,9, y siendo el catión correspondiente uno química o farmacéuticamente aceptable .

10 En este contexto, la expresión "químicamente aceptable" se refiere a un catión que es útil para la síntesis química, tal como ión amonio o trialquil( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )amonio, o para la purificación de los productos.

15 Ventajosamente, desde aproximadamente el 60% hasta aproximadamente el 55% de R,  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  y  $\text{R}_3$  son hidrógeno y el resto son grupos  $\text{SO}_3^-$  para un grado de sulfatación desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 2,7.

20 Los glicosaminoglicanos de bajo peso molecular ventajosos están constituidos por una mezcla de cadenas en los que al menos el 80% de dichas cadenas tienen la fórmula I en la que n es desde 3 hasta 15.

25 Entre estos glicosaminoglicanos de bajo peso molecular, son particularmente ventajosos aquéllos en los que dicha mezcla de cadenas tiene una distribución de peso molecular que oscila entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 10.000, con un peso molecular medio de desde aproximadamente 4.000 hasta aproximadamente 8.000.

30 Los glicosaminoglicanos preferidos de esta clase están constituidos por una mezcla de cadenas con un peso molecular medio de desde aproximadamente 6.000 hasta aproximadamente 8.000, en los que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I anterior, en la que aproximadamente el 55% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico y  $\text{R}_3$  es desde aproximadamente el 85% hasta aproximadamente el 90% de  $\text{SO}_3^-$ ;  $\text{R}_2$  es aproximadamente el 20% de  $\text{SO}_3^-$ ;  $\text{R}_1$  es desde aproximadamente el 25% hasta aproximadamente el 30% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades idurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades glucurónicas; R es desde aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 35% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades glucurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% en unidades idurónicas; la suma del porcentaje de  $\text{SO}_3^-$  en  $\text{R}_1$ , unidades glucurónicas y en R, unidades idurónicas, es aproximadamente el 5%; no siendo  $\text{R}_1$  y R simultáneamente  $\text{SO}_3^-$  y siendo ambos hidrógeno en desde aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 40% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 2,7, siendo el catión correspondiente uno química o farmacéuticamente aceptable .

35 Un glicosaminoglicano de bajo peso molecular particularmente preferido de esta clase está constituido por una mezcla de cadenas con un peso molecular medio de aproximadamente 7.000, en el que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I anterior, en la que aproximadamente el 55% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico y

40 -  $\text{R}_3$  es aproximadamente el 85% de  $\text{SO}_3^-$ ;

-  $\text{R}_2$  es aproximadamente el 20% de  $\text{SO}_3^-$ ;

45 -  $\text{R}_1$  es aproximadamente el 25% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades idurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades glucurónicas;

- R es aproximadamente el 30% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades glucurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% en unidades idurónicas;

50 - la suma del porcentaje de  $\text{SO}_3^-$  en  $\text{R}_1$ , unidades glucurónicas y en R, unidades idurónicas, es aproximadamente el 5%;

no siendo  $\text{R}_1$  y R simultáneamente  $\text{SO}_3^-$  y siendo ambos hidrógeno en aproximadamente el 40% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación aproximadamente 2,55, siendo el catión correspondiente uno química o farmacéuticamente aceptable .

55 El porcentaje del grupo sulfato en la posición 3 del ácido glucurónico y la posición 2 de los restos del ácido idurónico se han determinado mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN en el compuesto obtenido tras la etapa (iv), midiendo las áreas de los picos a 83 y 62 ppm, atribuibles a la unidad de ácido 3-O-sulfo-glucurónico y, respectivamente, a la unidad de ácido 2-O-sulfo-idurónico y considerando que el porcentaje de los grupos  $\text{SO}_3^-$  añadidos en la etapa (vi), con respecto a la cantidad total de grupos sulfato, es despreciable.

60 Cationes química y farmacéuticamente aceptables ventajosos son los derivados de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio, trialquil( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )amonio, aluminio y zinc, siendo particularmente preferidos los iones de sodio y calcio.

65 Los glicosaminoglicanos de alto peso molecular ventajosos están constituidos por una mezcla de cadenas en los que al menos el 80% de dichas cadenas tienen la estructura I en la que n es desde 20 hasta 100.

Entre estos glicosaminoglicanos, se prefieren aquéllos en los que dicha mezcla de cadenas tiene una distribución de peso molecular que oscila entre aproximadamente 9.000 y aproximadamente 60.000, prefiriéndose un peso molecular medio de desde aproximadamente 12.000 hasta aproximadamente 30.000.

5 Un glicosaminoglicano de alto peso molecular particularmente preferido de esta clase está constituido por una mezcla de cadenas con un peso molecular medio de 14.000-16.000, en el que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I anterior, en la que aproximadamente el 55% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico y

10 - R<sub>3</sub> es desde aproximadamente el 85% hasta aproximadamente el 90% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;

- R<sub>2</sub> es aproximadamente el 20% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;

15 - R<sub>1</sub> es desde aproximadamente el 25% hasta aproximadamente el 30% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas;

- R es desde aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 35% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% en unidades idurónicas;

20 - la suma del porcentaje de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en R<sub>1</sub>, unidades glucurónicas y en R, unidades idurónicas, es aproximadamente el 5%;

no siendo R<sub>1</sub> y R simultáneamente SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y siendo ambos hidrógeno en desde aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 40% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 2,7, siendo el catión correspondiente uno química o farmacéuticamente aceptable. Un peso molecular medio preferido es aproximadamente 15.700.

25 Los glicosaminoglicanos novedosos que pueden obtenerse mediante el procedimiento que comprende secuencialmente las etapas (i)-(vi) anteriores, incluyendo la despolimerización opcional y la formación de una sal, en particular los constituidos por una mezcla de cadenas en los que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I, en la que R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son tal como se definieron anteriormente y en la que el catión correspondiente es uno química o farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un ión sodio o calcio, muestran actividades biológicas interesantes en los parámetros de coagulación. Particularmente, dichos glicosaminoglicanos novedosos muestran actividades anti-Xa y HCII al menos del mismo orden que la de la heparina convencional, una actividad anti-IIa (antitrombina) superior a la actividad de la heparina convencional y una actividad anticoagulante global (expresada como título de TTPa) inferior a la de heparina convencional. Más particularmente, dichos glicosaminoglicanos novedosos muestran razones anti-Xa/TTPa, HCII/TTPa y anti-IIa/anti-Xa de desde 1,5 hasta 3 y una razón HCII/anti-Xa de desde 1 hasta 3.

Debido a sus características, los glicosaminoglicanos de la presente invención pueden usarse solos o en combinación con excipientes o diluyentes farmacéuticos aceptables, para el control de la coagulación y para el tratamiento antitrombótico, en particular para la prevención o para el tratamiento de la trombosis.

40 Por tanto, es un objeto adicional de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, una cantidad farmacológicamente activa de un glicosaminoglicano K5-N,O-sulfato epimerizado en C5 que puede obtenerse según el procedimiento en el que se realizan las etapas (i)-(vi) anteriores, incluyendo la despolimerización opcional y la formación de una sal farmacéuticamente aceptable tal como se ilustró anteriormente en combinación con excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

50 Preferiblemente, el principio activo puede obtenerse según las etapas (i)-(vi) anteriores, incluyendo la formación de una sal farmacéuticamente aceptable, partiendo desde un K5 purificado previamente y llevando a cabo la etapa (iv) en dimetilsulfóxido/metanol 9/1 (V/V) a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 150 minutos, y sometiendo el K5 N,O-sulfato epimerizado en C5 obtenido al final de la etapa (vi) a despolimerización. Preferiblemente, el principio activo de glicosaminoglicano K5-N,O-sulfato epimerizado en C5 así obtenido está en la forma de una sal de metal alcalino, metal alcalinotérreo, aluminio o zinc

55 Particularmente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad farmacológicamente eficaz de un glicosaminoglicano constituido por una mezcla de cadenas en el que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I anterior, en la que el 40-60% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico, n es un número entero desde 3 hasta 100, R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan un átomo de hidrógeno o un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y siendo desde aproximadamente el 65% hasta aproximadamente el 50% de R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> hidrógeno y siendo el resto grupos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> distribuidos de la siguiente forma

60 - R<sub>3</sub> es desde aproximadamente el 85% hasta aproximadamente el 95% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;

- R<sub>2</sub> es desde aproximadamente el 17 hasta aproximadamente el 21% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;

65 - R<sub>1</sub> es desde aproximadamente el 15 hasta aproximadamente el 35% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas y del 0 al 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas;

## ES 2 371 232 T3

- R es desde aproximadamente el 20 hasta aproximadamente el 40% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades glucurónicas y del 0 al 5% en unidades idurónicas;
- 5 - la suma del porcentaje de  $\text{SO}_3^-$  en  $\text{R}_1$ , unidades glucurónicas, y en R, unidades idurónicas, es desde el 3 hasta el 7%;
- no siendo  $\text{R}_1$  y R simultáneamente  $\text{SO}_3^-$  y siendo ambos hidrógeno en el 25-45% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación desde aproximadamente 2,3 hasta aproximadamente 2,9, y siendo el catión correspondiente uno farmacéuticamente aceptable, tal como un principio activo, y un vehículo farmacéutico.
- 10 Más particularmente, las composiciones anteriores están indicadas para el control de la coagulación o para la prevención o del tratamiento de la trombosis
- 15 En dichas composiciones farmacéuticas, para uso intravenoso, subcutáneo o tópico, dicho principio activo de glicosaminoglicano está presente en una dosis eficaz para la prevención o el tratamiento de enfermedades provocadas por trastornos del sistema de coagulación, tal como trombosis arterial o venosa, para el tratamiento de hematomas o como agentes de control de la coagulación durante operaciones quirúrgicas.
- 20 En preparaciones para uso intravenoso o subcutáneo, se disuelve el principio activo de glicosaminoglicano en agua, si es necesario en presencia de un tampón y se introduce la disolución en viales o jeringas en condiciones estériles.
- Dosis unitarias de dichas composiciones farmacéuticas contienen desde 5 hasta 100 mg, ventajosamente desde 20 hasta 50 mg del principio activo disuelto en de 0,1 a 2 ml de agua.
- 25 En composiciones para uso tópico, el principio activo de glicosaminoglicano se mezcla con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica para la preparación de geles, cremas, pomadas, lociones o disoluciones que van a pulverizarse. En dichas composiciones, ventajosamente el principio activo de glicosaminoglicano está presente en una concentración de desde el 0,01% hasta el 15% en peso.
- 30 Las composiciones farmacéuticas ventajosas comprenden, como principio activo, una cantidad farmacológicamente activa de un glicosaminoglicano constituido por una mezcla de cadenas de fórmula I, tal como se ilustró anteriormente, en las que el contraión es uno farmacéuticamente aceptable, ventajosamente un catión seleccionado del grupo que consiste en iones de metal alcalino, metal alcalinotérreo, aluminio y zinc, preferiblemente el ión sodio o calcio, y un vehículo farmacéutico.
- 35 Entre estos glicosaminoglicanos ventajosos, son principios activos preferidos los que contienen al menos el 80% de cadenas de fórmula I en la que n es desde 3 hasta 15 o desde 20 hasta 100, siendo particularmente preferidos aquéllos en los que la mezcla de cadenas tiene una distribución de peso molecular que oscila entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 10.000, con un peso molecular medio de desde aproximadamente 4.000 hasta aproximadamente 8.000 o una distribución de peso molecular que oscila entre aproximadamente 9.000 y aproximadamente 60.000, con un peso molecular medio de desde aproximadamente 12.000 hasta aproximadamente 30.000.
- 40 Las composiciones farmacéuticas particularmente ventajosas comprenden, como principio activo, un glicosaminoglicano constituido por una mezcla de cadenas despolimerizadas en el que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I anterior, en la que el 40-60% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico, n es un número entero desde 3 hasta 100, R,  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  y  $\text{R}_3$  representan un átomo de hidrógeno o un grupo  $\text{SO}_3^-$ , siendo desde aproximadamente el 65% hasta aproximadamente el 50% de R,  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  y  $\text{R}_3$  hidrógeno y siendo el resto grupos  $\text{SO}_3^-$  distribuidos de la siguiente forma
- 45 -  $\text{R}_3$  es desde aproximadamente el 85% hasta aproximadamente el 95%, de manera preferible aproximadamente el 85% de  $\text{SO}_3^-$ ;
- $\text{R}_2$  es desde aproximadamente el 17 hasta aproximadamente el 21%, de manera preferible aproximadamente el 20% de  $\text{SO}_3^-$ ;
- 55 -  $\text{R}_1$  es desde aproximadamente el 15 hasta aproximadamente el 35%, de manera preferible aproximadamente el 25% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades idurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades glucurónicas;
- R es desde aproximadamente el 20 hasta aproximadamente el 40% de  $\text{SO}_3^-$  en unidades glucurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% en unidades idurónicas;
- 60 - la suma del porcentaje de  $\text{SO}_3^-$  en  $\text{R}_1$ , unidades glucurónicas, y en R, unidades idurónicas, es desde aproximadamente el 3 hasta aproximadamente el 7%;
- 65 no siendo  $\text{R}_1$  y R simultáneamente  $\text{SO}_3^-$  y siendo ambos hidrógeno en el 25-45% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación desde aproximadamente 2,3 hasta aproximadamente 2,9, preferiblemente desde

aproximadamente el 2,4 hasta aproximadamente el 2,7, y siendo el catión correspondiente uno farmacéuticamente aceptable, conteniendo dicha mezcla de cadenas despolimerizadas al menos el 80% de dichas cadenas con una distribución de peso molecular en el intervalo de desde aproximadamente 2.000 hasta aproximadamente 10.000 y un peso molecular medio de desde aproximadamente 4.000 hasta aproximadamente 8.000.

5 Composiciones farmacéuticas ventajosas comprenden, como principio activo, una cantidad farmacológicamente activa de un glicosaminoglicano constituido por una mezcla de cadenas con un peso molecular medio de desde aproximadamente 6.000 hasta aproximadamente 8.000, en el que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I anterior, en la que aproximadamente el 55% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico y  $R_3$  es desde aproximadamente el 85% hasta aproximadamente el 90% de  $SO_3^-$ ;  $R_2$  es aproximadamente el 20% de  $SO_3^-$ ;  $R_1$  es desde aproximadamente el 25% hasta aproximadamente el 30% de  $SO_3^-$  en unidades idurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% de  $SO_3^-$  en unidades glucurónicas;  $R$  es desde aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 35% de  $SO_3^-$  en unidades glucurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% en unidades idurónicas; la suma del porcentaje de  $SO_3^-$  en  $R_1$ , unidades glucurónicas y en  $R$ , unidades idurónicas, es aproximadamente el 5%; no siendo  $R_1$  y  $R$  simultáneamente  $SO_3^-$  y siendo ambos hidrógeno en desde aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 40% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 2,7, siendo el catión correspondiente uno química o farmacéuticamente aceptable .

20 Un principio activo de glicosaminoglicano de bajo peso molecular preferido de esta clase está constituido por una mezcla de cadenas con un peso molecular medio de aproximadamente 7.000, en el que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I anterior, en el que aproximadamente el 55% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico y

- 25 -  $R_3$  es aproximadamente el 85% de  $SO_3^-$ ;
- $R_2$  es aproximadamente el 20% de  $SO_3^-$ ;
- $R_1$  es aproximadamente el 25% de  $SO_3^-$  en unidades idurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% de  $SO_3^-$  en unidades glucurónicas;
- 30 -  $R$  es aproximadamente el 30% de  $SO_3^-$  en unidades glucurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% en unidades idurónicas;
- la suma del porcentaje de  $SO_3^-$  en  $R_1$ , unidades glucurónicas, y en  $R$ , unidades idurónicas, es aproximadamente el 5%;
- 35 no siendo  $R_1$  y  $R$  simultáneamente  $SO_3^-$  y siendo ambos hidrógeno en aproximadamente el 40% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación aproximadamente 2,55, siendo el catión correspondiente uno farmacéuticamente aceptable. Un principio activo de glicosaminoglicano particular preferido tiene estas características, con un peso molecular medio de 7.400.

40 Finalmente, la presente invención se refiere a la cantidad eficaz de dichos glicosaminoglicanos para el control de la coagulación y para un tratamiento antitrombótico.

45 Por tanto, es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método para controlar la coagulación en un mamífero o para la prevención o el tratamiento de la trombosis, que comprende administrar a dicho mamífero, que necesita dicho control de coagulación o que necesita de dicha prevención o tratamiento, una cantidad farmacológicamente eficaz de un glicosaminoglicano K5-N,O-sulfato epimerizado en C5 que puede obtenerse según el procedimiento en el se realizan que las etapas (i)-(vi) anteriores, incluyendo la despolimerización opcional y la formación de una sal farmacéuticamente aceptable.

50 Más particularmente, dicho método comprende administrar a dicho mamífero una cantidad farmacológicamente activa de un glicosaminoglicano constituido por una mezcla de cadenas en el que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I tal como se ilustró y especificó anteriormente.

55 Preferiblemente, el método de la presente invención comprende administrar a dicho mamífero una dosis farmacológicamente activa de una composición farmacéutica tal como se ilustró anteriormente.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, sin embargo, sin limitarla.

60 Las características típicas de peso molecular y actividad biológica de los glicosaminoglicanos están indicadas en el presente documento en comparación con heparina no fraccionada (cuarta norma internacional) y heparina de bajo peso molecular (primera norma internacional).

65 El peso molecular, en particular el peso molecular medio, se calcula según Harenberg y De Vries, J. Chromatography, 1983, 261, 287-292 o bien usando una sola columna (75HR de Pharmacia) o bien usando dos columnas (Bio-sil

SEC250 de BioRad). Los pesos moleculares del producto final pueden ser diferentes a los de los polisacáridos de partida debido a las condiciones de reacción del procedimiento de la invención.

5 Se determina la actividad Anti-Xa según D.P. Thomas *et al.*, Thrombosis and Haemostasis, 1981, 45, 214, frente a la cuarta norma internacional de heparina.

La prueba de TTPa para determinar la actividad anticoagulante global se lleva a cabo según Andersson *et al.*, Thrombosis Research, 1976, 9, 575.

10 La prueba para determinar la actividad de HCII se realiza mezclando 20  $\mu$ l de una disolución de 0,05 PEU/ml (unidad de plasma equivalente) de HCII (Stago) disuelta en agua con 80  $\mu$ l de una disolución de la muestra en examen a diferentes concentraciones y 50  $\mu$ l de trombina (0,18 U/ml-Boehringer) en tampón Tris 0,02 M pH 7,4 que contiene HCl 0,15 M y PEG-6.000 al 0,1%. Se incuba la disolución durante 60 segundos a 37°C, luego se añaden 50  $\mu$ l de sustrato cromogénico Spectrozyme 1 nM (American Diagnostic). La reacción se registra de manera continua durante 180  
15 segundos con determinaciones cada segundo a 405 nm usando un coagulómetro automático ACL 7000 (Instrumentation Laboratory).

20 La prueba de anti IIa se realiza mezclando 30  $\mu$ l de una disolución que contiene 0,5 U/ml de ATIII (Chromogenix) disuelta en tampón Tris 0,1 M de pH 7,4 con 30  $\mu$ l de una disolución de la muestra en examen a diferentes concentraciones y 60  $\mu$ l de trombina [5,3 nKat (unidades de actividad enzimática)/ml de Chromogenix] en tampón Tris 0,1 M pH 7,4. Se incuba la disolución durante 70 segundos a 37°C, luego se añaden 60  $\mu$ l de sustrato cromogénico S-2238 0,5 mM (Chromogenix) en agua. La reacción se registra de manera continua durante 90 segundos con determinaciones cada segundo a 405 nm usando un coagulómetro automático ACL 7000 (Instrumentation Laboratory).

25 Se determina la afinidad por ATIII según Höök *et al.*, FEBS Letters, 1976, 66, 90-93.

#### Ejemplo 1

30 Una cantidad de 10 g de polisacárido K5, obtenido mediante fermentación tal como se describe en la solicitud de patente italiana MI99A001465 (documento WO 01/02597) con una pureza de 80% (figura2), se disuelve en agua desionizada para obtener una disolución al 1%. Se añade Triton X-100 hasta alcanzar una concentración del 5% y se mantiene la disolución a 55°C durante 2 horas con agitación. La disolución se lleva hasta 75°C y se mantiene a esta temperatura hasta que se obtiene un sistema turbio homogéneo y luego se enfría rápidamente la disolución hasta temperatura ambiente. Durante el enfriamiento se forman dos fases. Dicho tratamiento térmico se repite dos veces en la fase superior (fase orgánica). La fase acuosa que contiene K5 finalmente se concentra 1/10 a presión reducida y se precipita con acetona o etanol. Se deshecha la fase orgánica.

40 El producto obtenido es K5 con 90% pureza detectada mediante RMN de protón (figura 3) en comparación con el espectro del patrón de trabajo (figura 1) y un tiempo de retención de 9 minutos en el análisis de HPLC usando dos columnas (Bio-sil SEC 250 de Bio Rad).

El procedimiento continúa según las siguientes etapas:

45 (i) Se disuelve el K5 purificado previamente en 1.000 ml de hidróxido de sodio 2 N y se mantiene a 60°C durante 18 horas. Se enfría la disolución hasta temperatura ambiente y luego se lleva a pH neutro con ácido clorhídrico 6N. Se obtiene K5 N-desacetilado. Se mantiene la disolución que contiene el K5 N-desacetilado a 40°C y se le añaden 10 gr de carbonato de sodio en una etapa y 20 gr. del producto de adición piridina.trióxido de azufre en 10 minutos. Al final de la reacción se enfría la disolución hasta temperatura ambiente y luego se lleva a pH 7,5-8 con una disolución de ácido clorhídrico al 5%. El producto obtenido, K5-N-sulfato, se purifica a partir de sales mediante diafiltración usando una membrana espiral de 1.000 D de punto de corte (cartucho Prepscale - Millipore). Se detiene el procedimiento de purificación cuando la conductividad del permeado es inferior a 100  $\mu$ S. El producto retenido por la membrana se concentra hasta el 10% del polisacárido usando el mismo sistema de diafiltración y luego se liofiliza. La razón N-sulfato/N-acetilo en el producto obtenido es 9,5/0,5 medida mediante <sup>13</sup>C-RMN (figura 4).

55 (ii) 1 - Preparación de la C5 epimerasa inmovilizada

A 5 mg de C5 epimerasa recombinante obtenida según el documento WO 98/48006, que corresponde a  $1,2 \times 10^{11}$  cpm (cuentas por minuto) disuelta en 200 ml de tampón Hepes 25 mM pH 7,4, que contiene KCl 0,1 M, Triton X-100 al 0,1% y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 15 mM, se le añaden 100 mg de K5-N-sulfato obtenido tal como se describe en la etapa (i). Se diafiltra la disolución con una membrana de 30.000 D a 4°C hasta la desaparición del K5-N-sulfato en el permeado. Se cambia el tampón de la disolución retenida por la membrana mediante diafiltración frente a NaHCO<sub>3</sub> 200 mM a pH 7 y, tras la concentración hasta 50 ml, se añaden 50 ml de resina Sepharose 4B activada con CNBr y se deja reaccionar durante la noche a 4°C. Al final de la reacción, la cantidad de enzima residual en el sobrenadante se mide con el método Quantigold (Diversified Biotec) tras la centrifugación. La enzima está ausente en el sobrenadante, lo que  
65 demuestra que con el método descrito la enzima está 100% inmovilizada. Para ocupar los sitios todavía disponibles se

- 5 lava la resina con Tris 100 mM pH 8. Para medir la actividad de la enzima inmovilizada se carga una cantidad de enzima inmovilizada teóricamente correspondiente a  $1,2 \times 10^7$  cpm en una columna. En la columna se disuelve 1 mg de K5-N-sulfato obtenido tal como se describe en la etapa (i) disuelto en tampón Hepes 25 mM, KCl 0,1M, EDTA 0,015 M, Triton X-100 al 0,01% pH 7,4, recirculándose a través de dicha columna a 37°C durante la noche a una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto.
- 10 Tras la purificación mediante el sistema cromatográfico con DEAE y la desalación en Sephadex G-10, la muestra se liofiliza y se analiza para determinar su contenido en ácido idurónico mediante la técnica RMN de protón tal como ya se describió en el documento en WO 96/14425.
- La razón ácido idurónico/ácido glucurónico es 30/70 (figura 5).
- 2 - Epimerización.
- 15 Una cantidad de 10 g de K5-N-sulfato se disuelve en 600 ml de tampón Hepes 25 mM pH 7 que contiene  $\text{CaCl}_2$  50 mM. La disolución obtenida se recircula a través de una columna de 50 ml que contiene la resina con la enzima inmovilizada.
- Esta reacción se realiza a 30°C con una velocidad de flujo de 200 ml/hora durante 24 horas. Se purifica el producto obtenido mediante ultrafiltración y precipitación con etanol. Se disuelve el sedimento en agua a una concentración del
- 20 10%.
- Se obtiene un producto epimerizado con una razón ácido idurónico/ácido glucurónico 54/46 frente a una razón 0/100 del material de partida.
- 25 Se calcula el porcentaje de epimerización mediante  $^1\text{H}$ -RMN (figura 6).
- El rendimiento calculado midiendo el contenido en ácido urónico frente al patrón mediante el método de carbazol (Bitter and Muir Anal. Biochem. 39 88-92 (1971)) es del 90%.
- 30 (iii) Se enfría la disolución que contiene el producto epimerizado obtenido en la etapa (ii) hasta 10°C con un baño de refrigeración y luego se aplica sobre una resina de intercambio catiónico IR 120  $\text{H}^+$  (50 ml). Tanto la columna como el envase de la disolución eluida se mantienen a 10°C. Tras el paso de la disolución se lava la resina con 3 volúmenes de agua desionizada. El pH del flujo que pasa es superior a 6. La disolución ácida se lleva a neutralidad con una disolución acuosa de hidróxido de tetrabutilamonio al 15%.
- 35 Se concentra la disolución hasta 1/10 del volumen en un evaporador rotatorio a vacío y se liofiliza. Se suspende el producto en 200 ml de dimetilformamida (DMF) y se le añaden 150 g del producto de adición piridina. $\text{SO}_3$  disuelto en 200 ml de DMF. Se mantiene la disolución a 45°C durante 18 horas. Al final de la reacción se enfría la disolución hasta temperatura ambiente y se le añaden 1,200 ml de acetona saturada con cloruro de sodio. Se separa el sedimento
- 40 obtenido del disolvente mediante filtración, se disuelve con 100 ml de agua desionizada y se añade cloruro de sodio hasta una concentración 0,2 M. La disolución se lleva a pH 7,5-8 con hidróxido de sodio 2 N y se añaden 300 ml de acetona. Se separa el sedimento mediante filtración. Se solubiliza el sólido obtenido con 100 ml de agua desionizada y se purifica a partir de las sales residuales mediante diafiltración tal como se describe en la etapa (i).
- 45 El análisis de  $^{13}\text{C}$ -RMN sobre una pequeña cantidad seca del producto sobresulfatado se muestra en la figura 7.
- (iv) La disolución que contiene el producto de la etapa (iii) se hace pasar sobre una resina de intercambio catiónico IR 120  $\text{H}^+$  (50 ml). Tras el paso de la disolución se lava la resina con 3 volúmenes de agua desionizada. El pH del flujo que
- 50 pasa es superior a 6. La disolución ácida se lleva a neutralidad con piridina. Se concentra la disolución hasta 1/10 del volumen en un evaporador rotatorio a 40°C a vacío y se liofiliza. Se añade el producto obtenido como sal de piridina con 500 ml de una disolución de DMSO/metanol (9/1 V/V). Se mantiene la disolución a 60°C durante 2,5 horas y luego se añaden 50 ml de agua desionizada y finalmente se trata con 1,650 ml de acetona saturada con cloruro de sodio. Se purifica el sólido obtenido mediante diafiltración tal como se describe en la etapa (i) y se obtiene una disolución a concentración del 10%.
- 55 El análisis mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN en una pequeña cantidad seca en la figura 8 muestra un contenido en grupos sulfato en la posición 6 del aminoazúcar del 20%.
- (v) La disolución que contiene el producto de la etapa (iv) se hace pasar sobre una resina de intercambio catiónico IR 120  $\text{H}^+$  (50 ml). Tras el paso de la disolución se lava la resina con 3 volúmenes de agua desionizada. El pH del flujo que
- 60 pasa es superior a 6. La disolución ácida se lleva a neutralidad con una disolución acuosa de hidróxido de tetrabutilamonio al 15%. Se concentra la disolución hasta 1/10 del volumen en un evaporador rotatorio a vacío y se liofiliza. Se suspende el producto como sal de tetrabutilamonio en 200 ml de DMF. Se enfría la suspensión hasta 0°C y se trata con 40 gr. del producto de adición piridina. $\text{SO}_3$  disuelto en 100 ml de DMF. Se añade el agente de sulfatación
- 65 en una etapa. Se mantiene la disolución a 0°C durante 1,5 horas y luego se trata con 750 ml de acetona saturada con cloruro de sodio.

Se purifica el sólido obtenido mediante diafiltración tal como se describe en la etapa (i).

(vi) Se trata la disolución de la etapa (v) tal como se describe en la etapa (i) para la N-sulfatación.

La  $^{13}\text{C}$ -RMN sobre una pequeña cantidad seca del producto obtenido se muestra en la figura 9.

El compuesto obtenido muestra un peso molecular medio de 15.700 (determinado según Harenberg y De Vries, J. Chromatography, usando dos columnas, Bio-sil SEC250 de BioRad), razón sulfato/carboxilo de 2,55, contenido en ácido idurónico del 54%, contenido en N-sulfato > del 90%, contenido en 6-O sulfato del 85%, contenido en glucosamina 3-O sulfatada del 20%, contenido en 2-O-sulfato del ácido idurónico del 25%, contenido en 3-O-sulfato del ácido glucurónico del 30%, contenido en unidades urónicas no O-disulfatadas, unidades urónicas no sulfatadas de aproximadamente el 40%. Teniendo en cuenta la razón sulfato/carboxilo de 2,55, se calcula mediante diferencia que está presente aproximadamente el 5% de grupos sulfato en las unidades de ácido glucurónico 2-O-sulfatado y ácido idurónico 3-O-sulfatado. Además, el compuesto obtenido contiene el 55 % de una fracción de alta afinidad por ATIII y las siguientes actividades anticoagulantes *in vitro* en comparación con las de la heparina convencional tomadas como 100: anti-Xa 157, TTPa 78, anti-IIa 373, HCII 161.

#### Ejemplo 2

El K5 N,O-sulfato epimerizado en C5 obtenido al final de la etapa (vi) del ejemplo 1 se despolimeriza con ácido nitroso en condiciones controladas tal como se describe en el documento WO 82/03627. Más particularmente, se disuelven 5 g de muestra en 250 ml de agua y se enfrían hasta 4°C con un baño termostático. Se lleva el pH hasta 2 con ácido clorhídrico 1 N enfriado previamente hasta 4°C, luego se le añaden 10 ml de una disolución de nitrito de sodio al 1% y, si es necesario, se lleva el pH hasta 2 con ácido clorhídrico 1 N. Se mantiene la mezcla con agitación lenta durante 15 minutos, se neutraliza la disolución con NaOH 1 N, enfriado previamente hasta 4°C, luego se le añaden 250 mg de borohidruro de sodio disuelto en 13 ml de agua desionizada y se continúa la agitación lenta durante 4 horas. Se lleva el pH de la mezcla hasta 5 con ácido clorhídrico 1 N, luego dicha mezcla se deja reposar con agitación durante 10 minutos para destruir el exceso de borohidruro de sodio, y finalmente se neutraliza con NaOH 1 N. Se recupera el producto mediante precipitación con 3 volúmenes de etanol y se seca en un horno a vacío. En la figura 10, se muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto así obtenido. El compuesto tiene un peso molecular medio de 7.400, razón sulfato/carboxilo de 255, contenido en ácido idurónico del 54%, contenido en N-sulfato > del 90%, contenido en 6-O-sulfato del 85%, contenido en glucosamina 3-O-sulfatada del 20%, contenido en 2-O-sulfato del ácido idurónico del 25%, contenido en 3-O-sulfato del ácido glucurónico del 30%, contenido en unidades urónicas no O-disulfatadas, unidades urónicas no sulfatadas del 40%. Teniendo en cuenta la razón sulfato/carboxilo de 2,55, mediante diferencia se calcula que el 5% de grupos sulfato están presentes en unidades de ácido glucurónico 2-O-sulfatado y ácido idurónico 3-O-sulfatado. Además, el glicosaminoglicano así obtenido contiene el 34 % de una fracción de alta afinidad por ATIII y las siguientes actividades anticoagulantes *in vitro* en comparación con las de la heparina tomadas como 100: anti-Xa 99, TTPa 52, anti-IIa 203, HCII 108. En comparación con dichas actividades de la primera Norma Internacional de heparina de bajo peso molecular (LMWH), tomadas como 100, el glicosaminoglicano K5-N,O-sulfato epimerizado en C5 despolimerizado así obtenido muestra las siguientes actividades anticoagulantes: anti Xa 117, TTPa 173, anti-IIa 615 (no se determino HCII por LMWH). Estos resultados muestran que, para el K5 N,O-sulfato epimerizado en C5 así obtenido,

- las razones anti-IIa/TTPa y anti-IIa/anti-Xa son aproximadamente cuatro veces y, respectivamente, dos veces tan altas como las de la heparina convencional;

- las razones anti-IIa/TTPa y anti-IIa/anti-Xa son aproximadamente 3,5 veces y, respectivamente, aproximadamente cinco veces tan altas como las de LMWH convencional;

- las razones HCII/TTPa y HCII/anti-Xa son aproximadamente dos veces y, respectivamente, aproximadamente tan altas como las de la heparina convencional; siendo las actividades anti-Xa y HCII aproximadamente tan altas como las de la heparina convencional y siendo la actividad TTPa aproximadamente la mitad que la de la heparina convencional.

#### Ejemplo 3

Se repite el ejemplo 1 usando, en la etapa (ii), la enzima recombinante obtenida tal como se describe en Jin-Ping L. *et al.* (Characterization of D-glucuronosyl-C5 epimerase involved in the biosynthesis of heparin and heparan sulphate. Journal Biological Chemistry, 2001, Vol. 276, 20069-20077). El compuesto obtenido muestra un peso molecular medio de 14.900 (determinado según Harenberg y De Vries, J. Chromatography, usando dos columnas, Bio-sil SEC250 de BioRad), razón sulfato/carboxilo de 2,7, contenido en ácido idurónico del 54%, contenido en N-sulfato > del 90%, contenido en 6-O-sulfato del 90%, contenido en glucosamina 3-O-sulfatada del 20%, contenido en 2-O-sulfato del ácido idurónico del 30%, contenido en 3-O-sulfato del ácido glucurónico del 35%, contenido en unidades urónicas no O-disulfatada, unidades urónicas no sulfatadas de aproximadamente el 30%. Teniendo en cuenta la razón sulfato/carboxilo de 2,7, mediante diferencia se calcula que aproximadamente el 5% de grupos sulfato están presentes en unidades de ácido glucurónico 2-O-sulfatado y ácido idurónico 3-O-sulfatado. Además, el compuesto obtenido muestra las siguientes



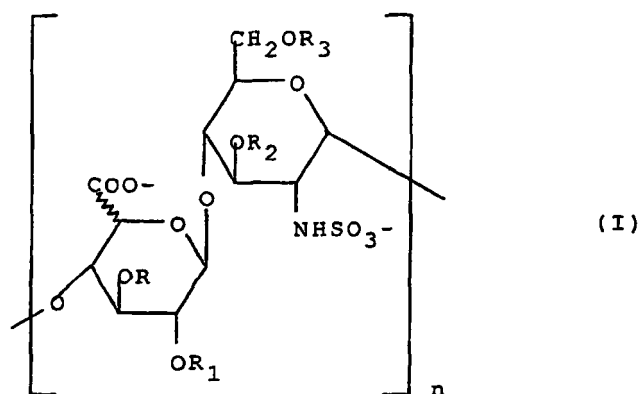
actividades anticoagulantes *in vitro* en comparación con las de al heparina convencional tomadas como 100: anti-Xa 166, TTPa 76, anti-IIa 400, HCII 283.

- 5 Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica, usando la descripción anterior, puede utilizar la presente invención en toda su extensión. Las realizaciones específicas preferidas anteriores, por tanto, deben interpretarse como meramente ilustrativas, y no limitativas del resto de la descripción en modo alguno.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la preparación de glicosaminoglicanos K5 que comprende las etapas de (i) N-desacetilación/N-sulfatación del polisacárido K5, (ii) epimerización en C5 parcial del grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico para dar el resto de ácido idurónico correspondiente, (iii) sobresulfatación, (iv) O-desulfatación selectiva, (v) 6-O-sulfatación opcional, y (vi) N-sulfatación, en el que la etapa (iv) comprende tratar el producto sobresulfatado obtenido al final de la etapa (iii) con una mezcla de metanol/dimetilsulfóxido durante un periodo de tiempo de desde 135 hasta 165 minutos.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho periodo de tiempo es de aproximadamente 150 minutos.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento se realiza durante un periodo de tiempo de 150 minutos a una temperatura de 60°C.
- 15 4. Procedimiento para la preparación de glicosaminoglicanos novedosos, que comprende
- (i) hacer reaccionar el polisacárido K5 con un agente de N-desacetilación, luego tratar el producto N-desacetilado con un agente de N-sulfatación;
- 20 (ii) someter el K5-N-sulfato así obtenido a una epimerización en C5 mediante la glucuronosil C5 epimerasa para obtener un K5-N-sulfato epimerizado en C5 en el que la razón glucurónico/idurónico es desde 60/40 hasta 40/60;
- (iii) convertir el K5-N-sulfato epimerizado en C5, que tiene un contenido del 40 al 60% en ácido idurónico con respecto a los ácidos urónicos totales, en una sal terciaria o cuaternaria del mismo, luego tratar la sal así obtenida con un agente de O-sulfatación en un disolvente polar aprótico a una temperatura de 40-60°C durante 10-20 horas;
- 25 (iv) tratar una sal con una base orgánica del producto O-sobresulfatado así obtenido con una mezcla de dimetilsulfóxido/metanol a 50-70°C durante 135-165 minutos;
- (v) tratar una sal con una base orgánica del producto parcialmente O-desulfatado así obtenido con un agente de O-sulfatación a una temperatura de 0-5°C;
- 30 (vi) tratar el producto así obtenido con un agente de N-sulfatación;
- sometiéndose opcionalmente cualquier producto obtenido al final de una de las etapas (ii) a (vi) a una despolimerización.
- 35 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que se usa un K5 purificado previamente como material de partida.
- 40 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 y 5, en el que, en la etapa (i), se usa hidrazina o una sal de la misma o un hidróxido de metal alcalino como agente de N-desacetilación y se usa el producto de adición piridina.trióxido de azufre o trimetilamina.trióxido de azufre como agente de N-sulfatación.
- 45 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-6, en el que, en la etapa (ii), dicha epimerización en C5 se realiza usando la enzima glucuronosil C5 epimerasa en disolución o en forma inmovilizada en presencia de cationes divalentes.
- 50 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dichos cationes divalentes comprenden al menos uno de Ba, Ca, Mg y Mn.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-8, en el que, en la etapa (ii), dicha epimerasa comprende glucuronosil C5 epimerasa recombinante, glucuronosil C5 epimerasa de mastocitoma murino y glucuronosil C5 epimerasa extraída de hígado bovino.
- 55 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-9, en el que se realiza dicha epimerización en C5 con la enzima en su forma inmovilizada y comprende hacer recircular 20-1.000 ml de una disolución de Hepes 25 mM a pH de desde 6 hasta 7,4 que contiene 0,001-10 g de K5-N-sulfato y uno de dichos cationes a una concentración de entre 10 y 60 mM a través de una columna que contiene desde  $1,2 \times 10^7$  hasta  $3 \times 10^{11}$  cpm de la enzima inmovilizada en un soporte inerte.
- 60 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-9, en el que dicho pH es de aproximadamente 7 y dicha epimerización en C5 se realiza con una enzima recombinante a una temperatura de 30°C haciendo recircular dicha disolución con una velocidad de flujo de aproximadamente 200 ml/hora durante un tiempo de 24 horas.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-11, en el que, en la etapa (iii), se usa el producto de adición piridina.trióxido de azufre como agente de O-sulfatación.
- 65 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-12, en el que, en la etapa (iv), la reacción se lleva a cabo en dimetilsulfóxido/metanol 9/1 (V/V) a 60°C durante 150 minutos.

- 5 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-13, en el que se usa un K5 purificado previamente como material de partida y, en la etapa (iv), la reacción se lleva a cabo en dimetilsulfóxido/metanol 9/1 (V/V) a 60°C durante 150 minutos.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-14, en el que, en la etapa (v), la 6-O-sulfatación se lleva a cabo a 0-5°C usando el producto de adición piridina.trióxido de azufre como agente de O-sulfatación.
- 10 16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-15, en el que, en la etapa (vi), se usa el producto de adición piridina.trióxido de azufre o trimetilamina.trióxido de azufre como agente de N-sulfatación.
17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-16, en el que el producto obtenido al final de la etapa (vi) se somete a una despolimerización con ácido nitroso seguida por una reducción con borohidruro de sodio.
- 15 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-17, en el que se usa un K5 purificado previamente como material de partida y, en la etapa (iv), la reacción se lleva a cabo en dimetilsulfóxido/metanol 9/1 (V/V) a 60°C durante 150 minutos, y el glicosaminoglicano K5-N,O-sulfato epimerizado en C5 obtenido al final de la etapa (vi) se somete a una despolimerización con ácido nitroso seguida por una reducción con borohidruro de sodio.
- 20 19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4-18, en el que el glicosaminoglicano así obtenido se aísla en forma de su sal de sodio.
20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicha sal de sodio se convierte adicionalmente en otra sal.
- 25 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha otra sal es otra sal de metal alcalino, o metal alcalinotérreo, amonio, trialkil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, aluminio o zinc.
22. Glicosaminoglicano K5-N,O-sulfato epimerizado en C5 que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende
- 30 (i) hacer reaccionar el polisacárido K5 con un agente de N-desacetilación, luego tratar el producto N-desacetilado con un agente de N-sulfatación;
- 35 (ii) someter el K5-N-sulfato así obtenido a una epimerización en C5 mediante la glucuronosil C5 epimerasa para obtener un K5-N-sulfato epimerizado en C5 en el que la razón glucurónico/idurónico es desde 60/40 hasta 40/60;
- (iii) convertir el K5-N-sulfato epimerizado en C5, que tiene un contenido del 40 al 60% en ácido idurónico con respecto a los ácidos urónicos totales, en una sal terciaria o cuaternaria del mismo, luego tratar la sal así obtenida con un agente de O-sulfatación en un disolvente polar aprótico a una temperatura de 40-60°C durante 10-20 horas;
- 40 (iv) tratar una sal con una base orgánica del producto O-sobresulfatado así obtenido con una mezcla de dimetilsulfóxido/metanol a 50-70°C durante 135-165 minutos;
- 45 (v) tratar una sal con una base orgánica del producto parcialmente O-desulfatado así obtenido con un agente de O-sulfatación a una temperatura de 0-5°C;
- (vi) hacer reaccionar el producto así obtenido con un agente de N-sulfatación;
- 50 sometiéndose opcionalmente cualquier producto obtenido al final de una de las etapas (ii) a (vi) a una despolimerización y convirtiéndose opcionalmente la sal de sodio del producto final en otra sal.
23. Glicosaminoglicano K5-N,O-sulfato epimerizado en C5 según la reivindicación 22, en el que la etapa (iv)' se lleva a cabo en una mezcla de dimetilsulfóxido/metanol 9/1 (V/V) a 60°C durante 150 minutos.
- 55 24. Glicosaminoglicano K5-N,O-sulfato epimerizado en C5 según la reivindicación 22, en el que se usa un K5 purificado previamente como material de partida y, en la etapa (iv), la reacción se lleva a cabo en dimetilsulfóxido/metanol 9/1 (V/V) a 60°C durante 150 minutos, y el producto obtenido al final de la etapa (vi) se somete a una despolimerización con ácido nitroso seguida por una reducción con borohidruro de sodio.
- 60 25. Glicosaminoglicano constituido por una mezcla de cadenas, en el que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I



5 en la que el 40-60% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico, n es un número entero desde 3 hasta 100, R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan un átomo de hidrógeno o un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y siendo desde aproximadamente el 65% hasta aproximadamente el 50% de R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> hidrógeno y siendo el resto grupos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> distribuidos de la siguiente forma

- R<sub>3</sub> es desde aproximadamente el 85% hasta aproximadamente el 95% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;
- R<sub>2</sub> es desde aproximadamente el 17 hasta aproximadamente el 21% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;
- R<sub>1</sub> es desde aproximadamente el 15 hasta aproximadamente el 35% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas y del 0 al 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas;
- R es desde aproximadamente el 20 hasta aproximadamente el 40% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas y del 0 al 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas;
- la suma del porcentaje de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en R<sub>1</sub>, unidades glucurónicas, y en R, unidades idurónicas, es desde el 3 hasta el 7%;

20 no siendo R<sub>1</sub> y R simultáneamente SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y siendo ambos hidrógeno en el 25-45% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación desde aproximadamente 2,3 hasta aproximadamente 2,9, y siendo el catión correspondiente uno química o farmacéuticamente aceptable.

26. Glicosaminoglicano según la reivindicación 25, en el que dicho catión correspondiente es un ión de metal alcalino, metal alcalinotérreo, aluminio o zinc.

27. Glicosaminoglicano según la reivindicación 25, en el que dicho catión correspondiente es ión sodio o calcio.

30 28. Glicosaminoglicano según una de las reivindicaciones 25-27, en el que desde aproximadamente el 60% hasta aproximadamente el 55% de R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son hidrógeno y el resto son grupos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> para un grado de sulfatación desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 2,7.

35 29. Glicosaminoglicano según una de las reivindicaciones 25-28, en el que al menos el 80% de dichas cadenas en dicha mezcla de cadenas tienen la fórmula I en la que n es desde 3 hasta 15.

30. Glicosaminoglicano según la reivindicación 29, en el que dichas cadenas en dicha mezcla de cadenas tienen una distribución de peso molecular que oscila entre 2.000 y 10.000, con un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 8.000.

40 31. Glicosaminoglicano según la reivindicación 30, en el que dichas cadenas en dicha mezcla de cadenas tienen un peso molecular medio de desde 6.000 hasta 8.000 y al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I, en la que el 55% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico y R<sub>3</sub> es desde el 85% hasta el 90% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R<sub>2</sub> es aproximadamente el 20% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R<sub>1</sub> es desde el 25% hasta el 30% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas y del 0 al 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas; R es desde el 30% hasta el 35% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas y del 0 a aproximadamente el 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas; la suma del porcentaje de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en R<sub>1</sub>, unidades glucurónicas y en R, unidades idurónicas es el 5%; no siendo R<sub>1</sub> y R simultáneamente SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y siendo ambos hidrógeno en desde el 30% hasta el 40% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación desde 2,5 hasta 2,7.

50 32. Glicosaminoglicano según la reivindicación 31, en el que dichas cadenas en dicha mezcla de cadenas tiene un peso molecular medio de 7.000 y al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I, en el que aproximadamente el 55% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico y

- R<sub>3</sub> es el 85% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;
  - R<sub>2</sub> es el 20% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;
- 5 - R<sub>1</sub> es el 25% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas y del 0 al 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas;
- R es el 30% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas y del 0 al 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas;
  - la suma del porcentaje de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en R<sub>1</sub>, unidades glucurónicas y en R, unidades idurónicas, es el 5%;
- 10 no siendo R<sub>1</sub> y R simultáneamente SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y siendo ambos hidrógeno en el 40% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación 2,55.
- 15 33. Glicosaminoglicano según la reivindicación 32, en el que dicha mezcla de cadenas tiene un peso molecular medio de 7.400.
34. Glicosaminoglicano según una de las reivindicaciones 25-28, en el que al menos el 80% de dichas cadenas en dicha mezcla de cadenas tienen la fórmula I en la que n es desde 20 hasta 100.
- 20 35. Glicosaminoglicano según la reivindicación 34, en el que dicha mezcla de cadenas tiene una distribución de peso molecular que oscila entre 9.000 y 60.000, con un peso molecular medio de desde 12.000 hasta 30.000.
- 25 36. Glicosaminoglicano según la reivindicación 35, en el que dichas cadenas en dicha mezcla de cadenas tienen un peso molecular medio de 14.000-16.000 y al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I, en la que el 55% de las unidades de ácido urónico son las del ácido idurónico y
- R<sub>3</sub> es desde el 85% hasta el 90% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;
  - R<sub>2</sub> es el 20% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,
- 30 - R<sub>1</sub> es desde el 25% hasta el 30% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas y del 0 al 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas;
- R es desde el 30% hasta el 35% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades glucurónicas y del 0 al 5% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en unidades idurónicas;
  - la suma del porcentaje de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en R<sub>1</sub>, unidades glucurónicas y en R, unidades idurónicas, es el 5%;
- 35 no siendo R<sub>1</sub> y R simultáneamente SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y siendo ambos hidrógeno en desde el 30% hasta el 40% de las unidades de ácido urónico; siendo el grado de sulfatación desde 2,5 hasta 2,7.
- 40 37. Glicosaminoglicano según la reivindicación 36, en el que dicha mezcla de cadenas tiene un peso molecular medio de 15.700.
- 45 38. Composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un glicosaminoglicano según una de las reivindicaciones 22-37, como una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como principio activo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
39. Uso de un glicosaminoglicano según una de las reivindicaciones 22-37 para la preparación de composiciones farmacéuticas para controlar la coagulación en un mamífero.
- 50 40. Uso de un glicosaminoglicano según una de las reivindicaciones 22-37 para la preparación de composiciones farmacéuticas para prevenir o tratar trombosis en un mamífero.
- 55 41. Uso según una de las reivindicaciones 39-40, en el que dicha composición farmacéutica contiene de 5 a 100 mg de dicho glicosaminoglicano.

Figura 1

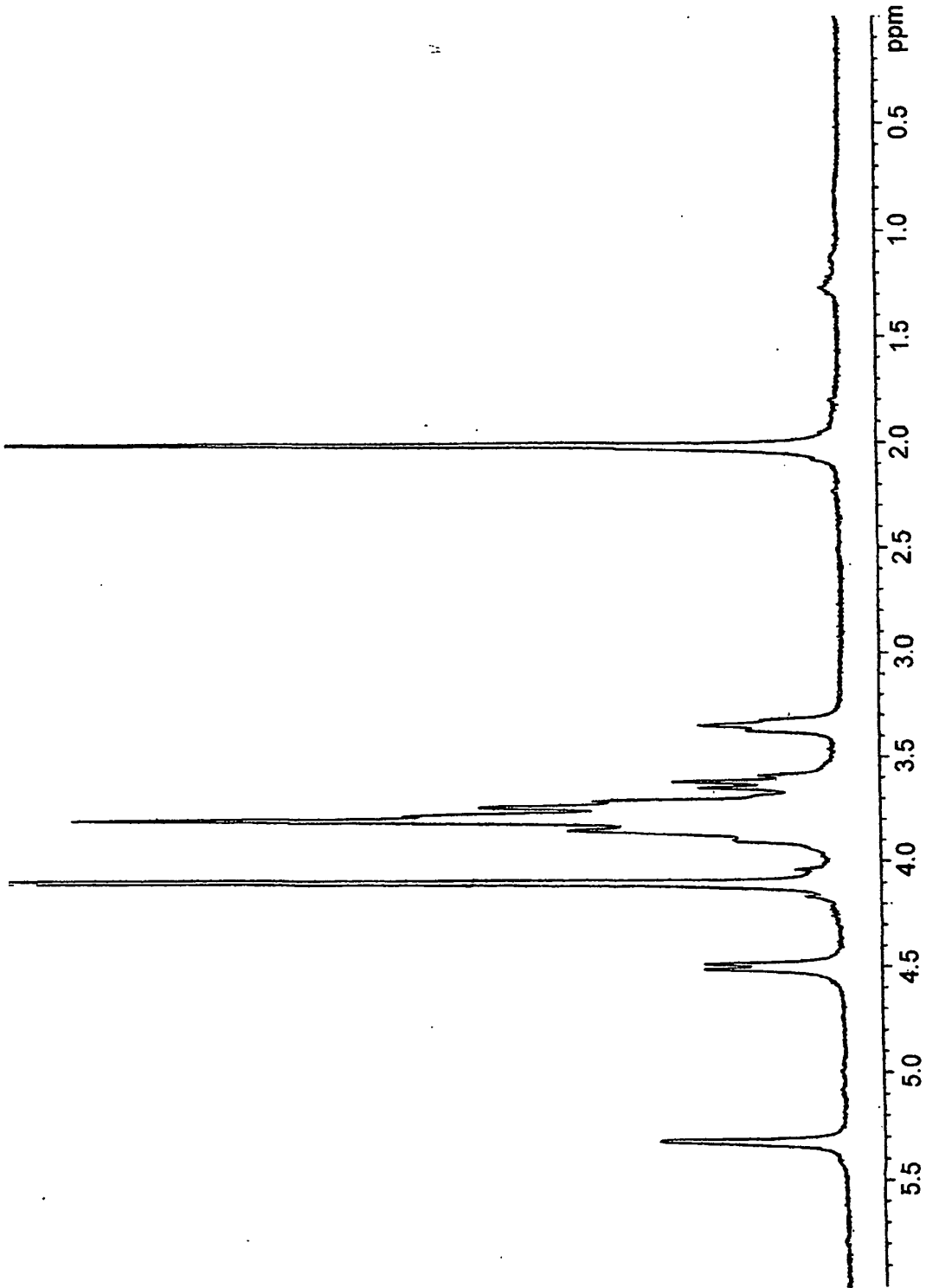


Figura 2

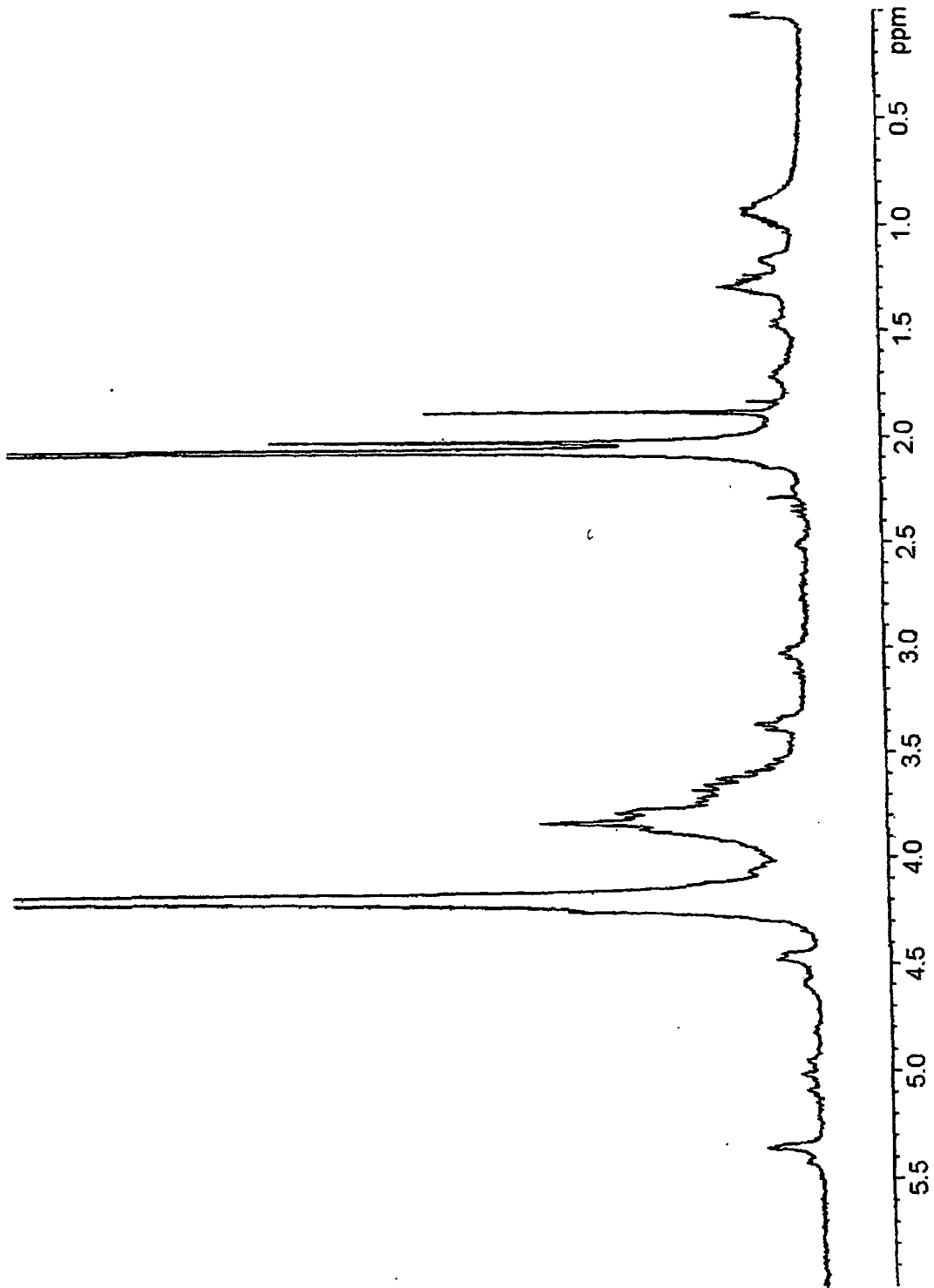


Figura 3

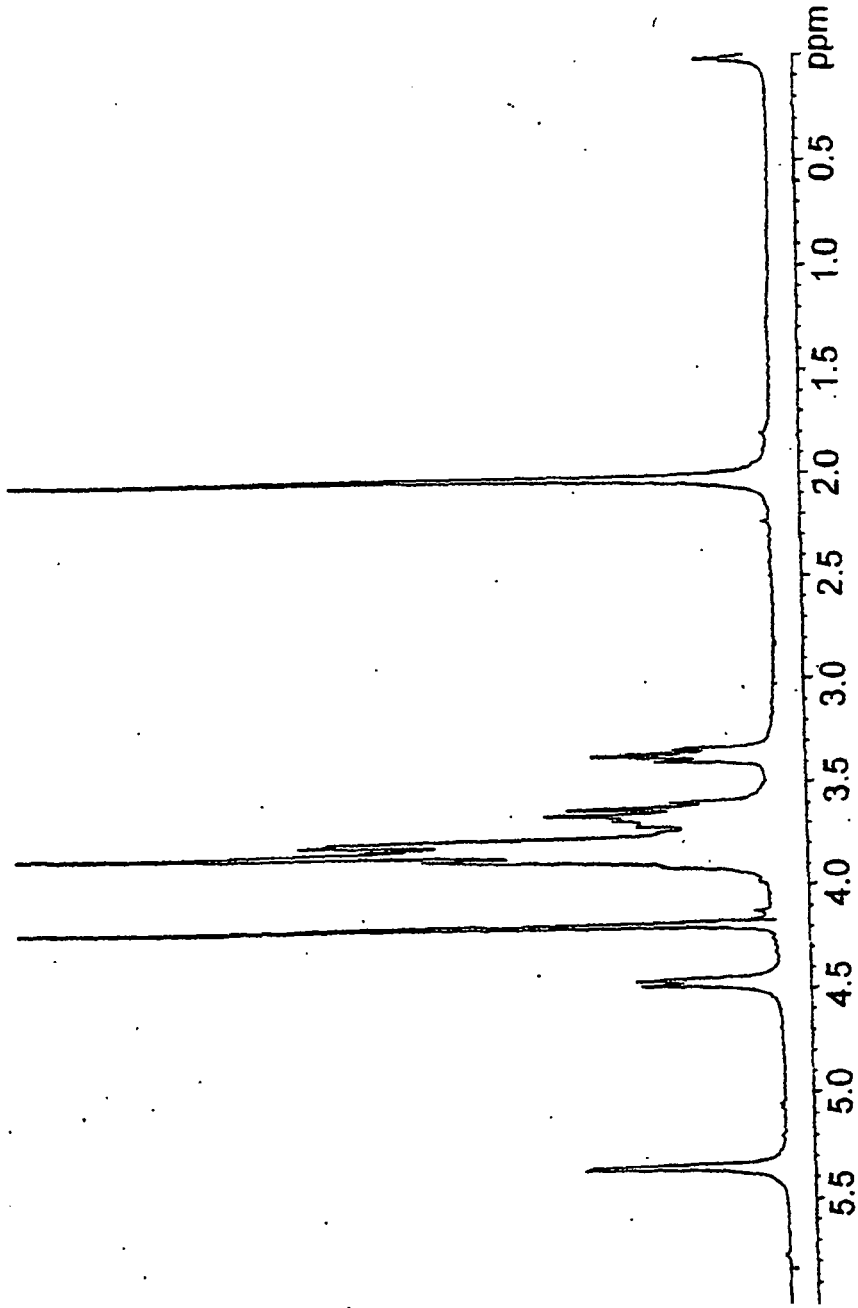




Figura 4

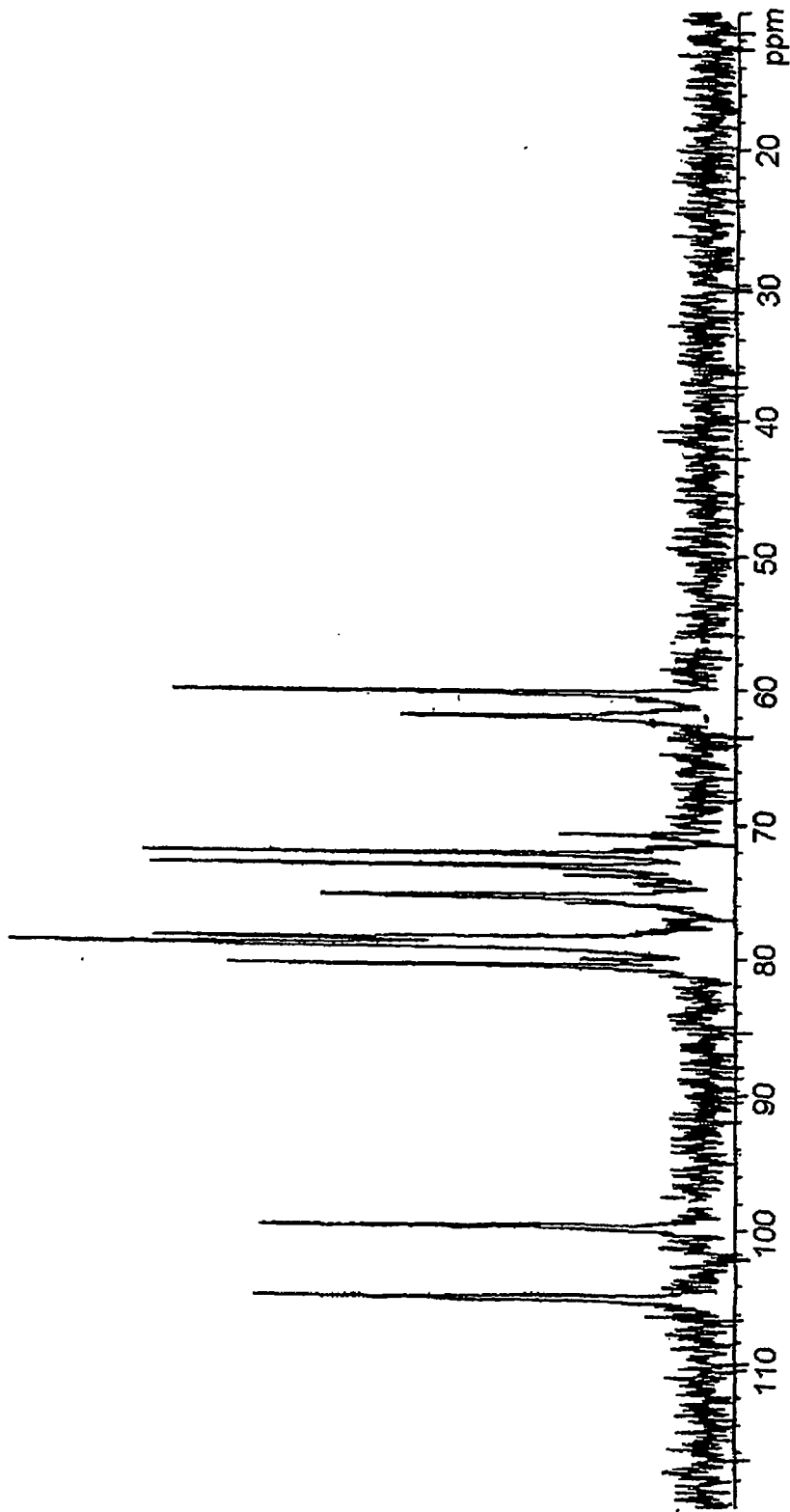


Figura 5

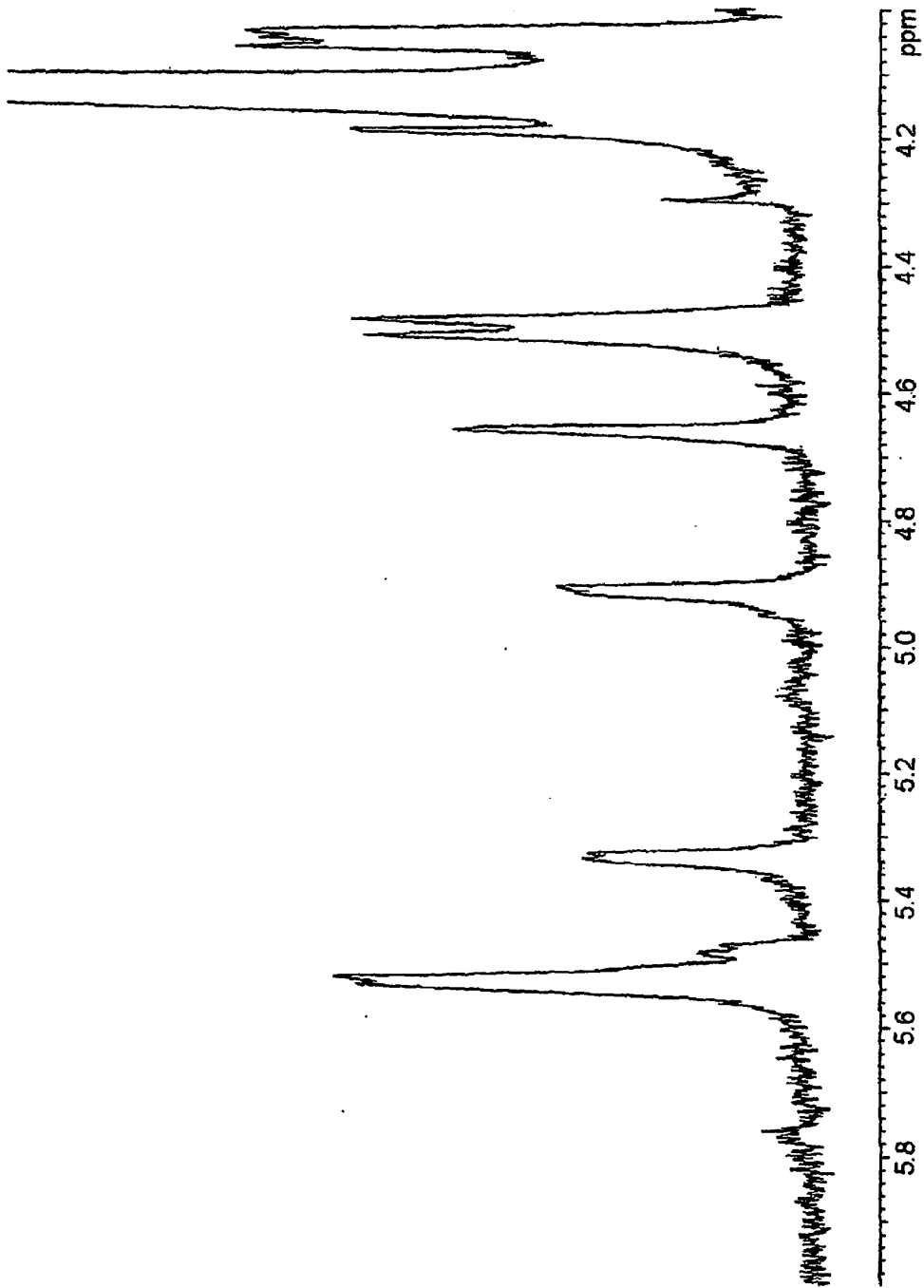


Figura 6

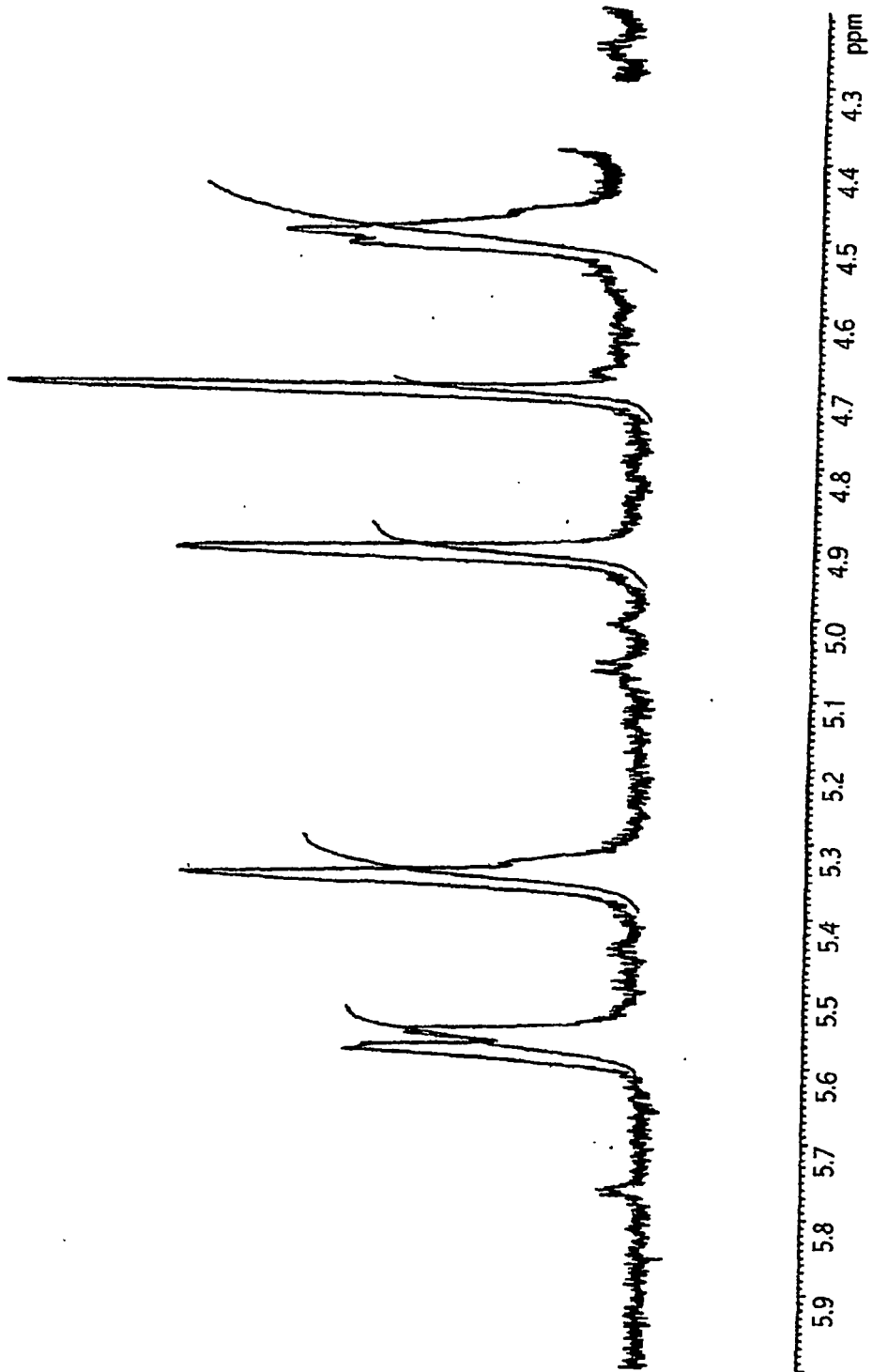


Figura 7

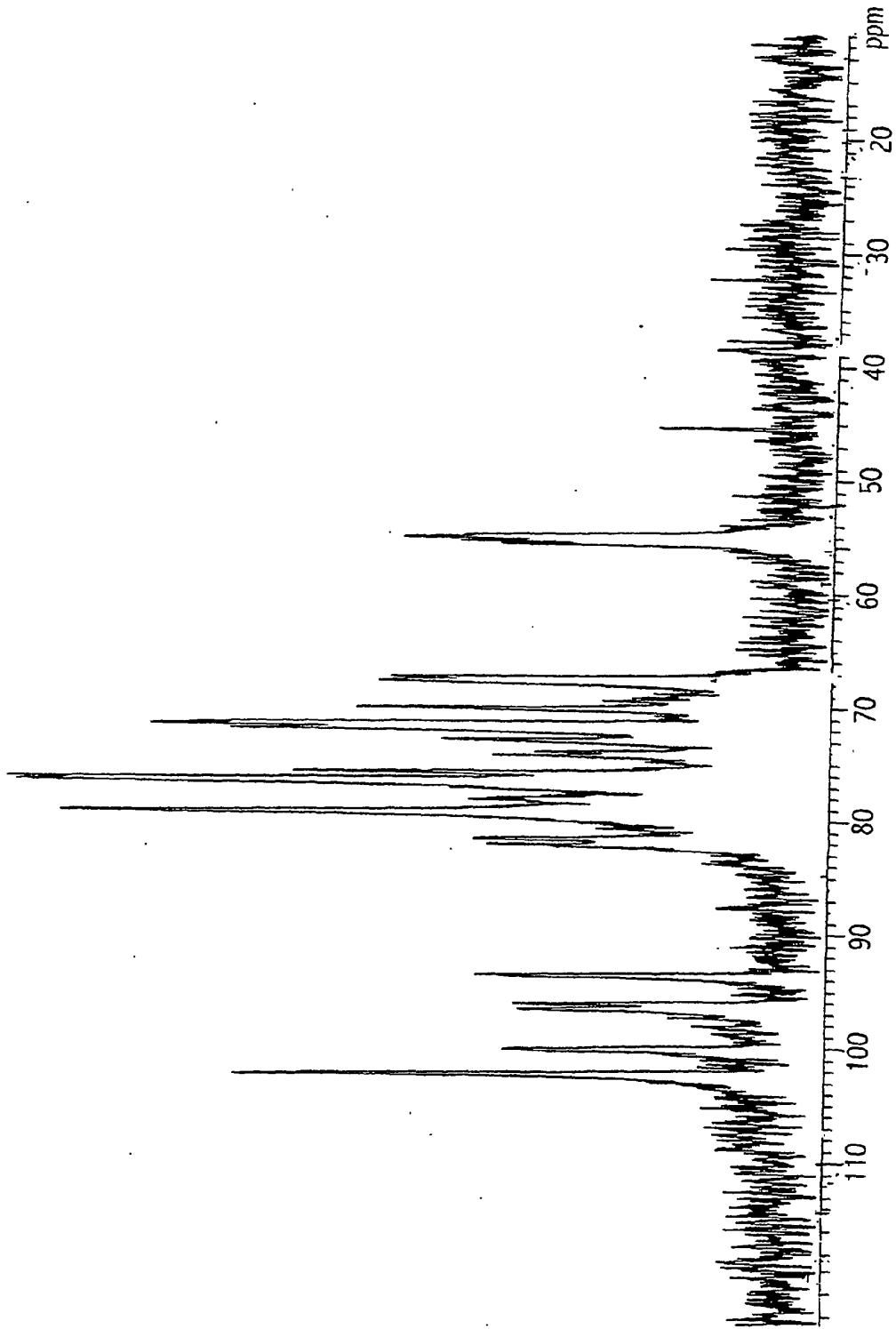


Figura 8

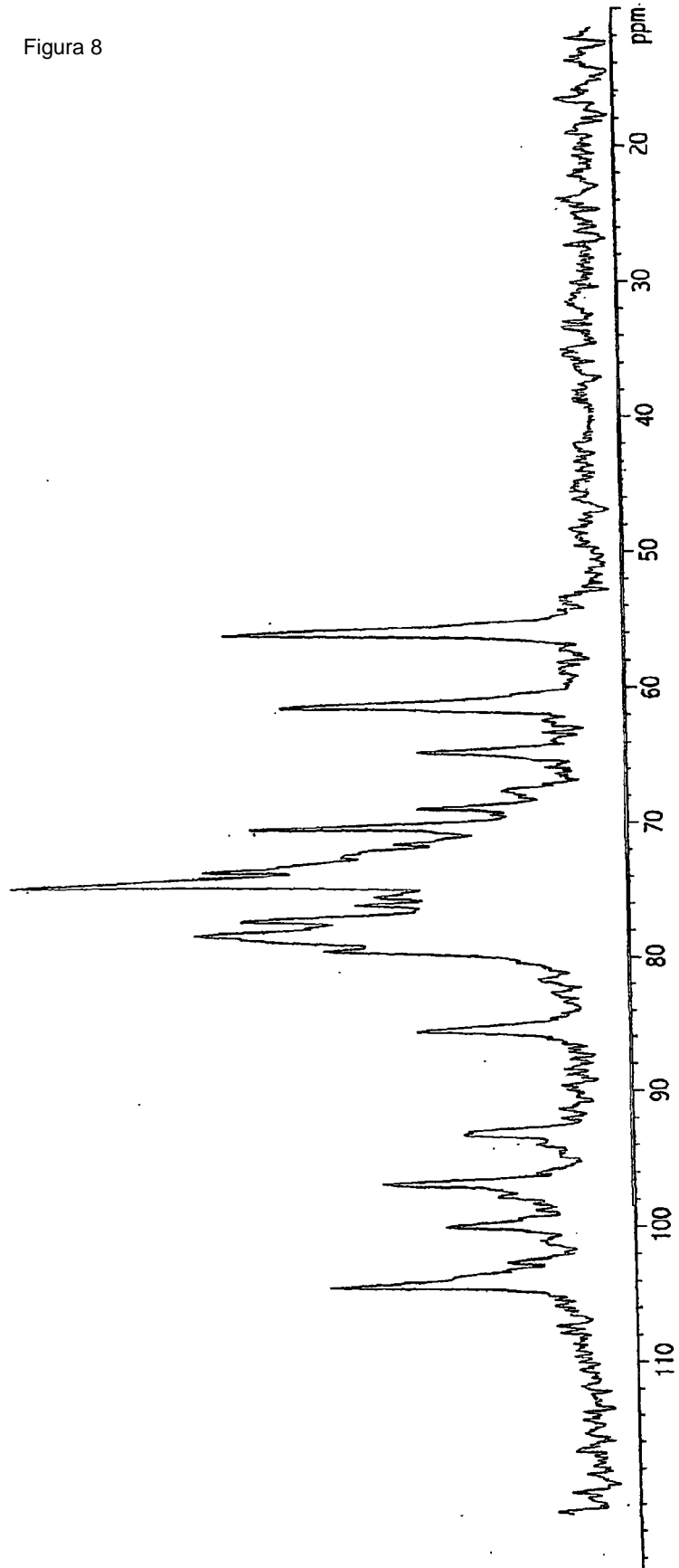


Figura 9

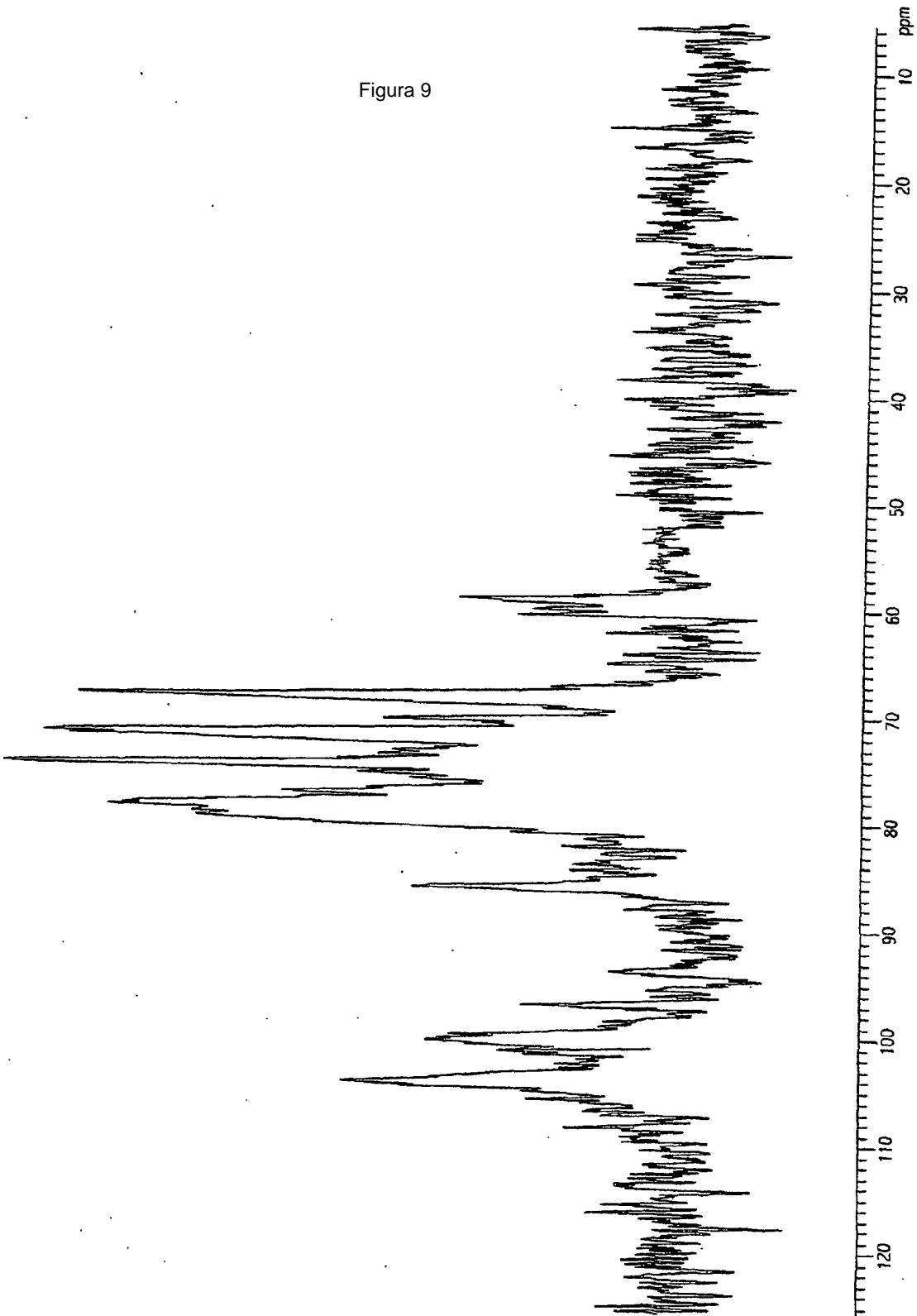


Figura 10

