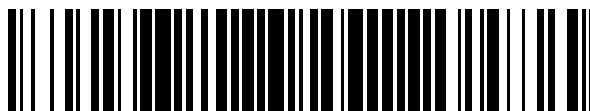


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 137**

51 Int. Cl.:
C08B 37/10 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04804499 .4**
96 Fecha de presentación: **13.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1675875**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2006**

54 Título: **Procedimiento multietapa para la despolimerización física de heparina y productos obtenidos a partir de la misma**

30 Prioridad:
16.10.2003 EP 03023377

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2012

73 Titular/es:
LABORATORI DERIVATI ORGANICI S.P.A.
(100.0%)
VIA M. BAROZZI, 4
20122 MILANO, IT

72 Inventor/es:
DE AMBROSI, LUIGI;
GONELLA, SERGIO;
BENSI, DONATA;
TORRI, GIANGIACOMO;
BISIO, ANTONELLA y
VISMARA, ELENA

74 Agente/Representante:
ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 390 137 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

Procedimiento multietapa para la despolimerización física de heparina y productos obtenidos a partir de la misma

5 Estado de la técnica

[0001] La heparina es un polisacárido altamente sulfatado, polidisperso, heterogéneo, que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos, constituido por unidades de repetición disacárido con enlace 1→4, que consisten en α-D-glucosamina (A) y un ácido hexurónico, ácido α-L-idurónico (I) o β-D-glucurónico (G), con grupos O-sulfato en diferentes posiciones de la unidad disacárido, especialmente en la posición 2 del idurónico (I₂S) y la posición 3 y 6 de la glucosamina (A₃S; A₆S), y grupos N-sulfato o N-acetilo en la posición 2 del residuo de glucosamina (A_{NS}; A_{NAC}). La secuencia de repetición del disacárido que aparece más frecuentemente es →4)-α-L-ácido idurónico-2-O-sulfato-(1→4)-α-D-glucosamina-N,6-disulfato (1 → (I₂S-A_{NS,6S}), que representa el segmento altamente sulfatado de heparina, localizado más cerca del extremo no reductor de la cadena de heparina. Las secuencias sub-sulfatadas, representadas por I y G y A_{NAC} no sulfatados están localizadas predominantemente hacia el extremo reductor del polímero. Aproximadamente un tercio de las cadenas de heparina contienen una secuencia de pentasacárido específica, caracterizada por un residuo A_{NS,6S} central que lleva un grupo sulfato extra en la posición 3 (A_{NS,3S,6S}), que constituye el sitio activo para la antitrombina III (AT). Muchos modelos bioquímicos, así como estudios estructurales, sugieren que tal pentasacárido está localizado entre los dominios altamente y sub-sulfatados. Una secuencia minoritaria, que implica residuos neutros como galactosa y xilosa, y correspondiente al extremo reductor de la cadena de polisacárido, es la región de unión (LR) a la proteína núcleo del proteoglicano.

[0002] El gran número de posibles variantes estructurales de las secuencias de heparina representa el amplio intervalo de actividades biológicas que la heparina promueve uniéndose a diferentes proteínas del plasma y tisulares, tales como inhibidores de proteasa de la cascada de coagulación de la sangre, factores de crecimiento, quimiocinas, proteínas matriciales adhesivas, etc. (Capila, & Linhardt, 2002). La identificación de las estructuras de heparina específicas responsables de la unión a los diversos ligandos de proteína supone un interés cada vez mayor. Aunque algunas proteínas, como AT, tienen afinidad solo por las irregularidades únicas de la estructura de la heparina, otras reconocen las regiones más regulares de la heparina, aunque este hecho no excluye la selectividad de unión (Maccarana, Casu, & Lindahl, 1993).

[0003] Dependiendo de su tamaño y disposición estructural, los oligosacáridos derivados de heparina pueden suscitar o inhibir efectos biológicos específicos. Típicamente, las secuencias de heparina con una longitud que varía de tetra a deca-sacáridos son responsables de la modulación de la actividad biológica de las proteínas.

[0004] Se ha demostrado recientemente que diferentes derivados de heparina de bajo y ultrabajo peso molecular, que varían de 1900 a 4600 Da, cruzan la barrera hematoencefálica (BBB) en ratas después de la administración oral o intravenosa, y que ejercen un efecto neuroprotector, potencialmente aprovechable en el tratamiento terapéutico de trastornos neurodegenerativos. Actualmente no está claro qué fracción de peso molecular de estos compuestos heterogéneos cruza la BBB, y tampoco qué requisito estructural está relacionado con la acción biológica en el cerebro. La heterogeneidad estructural de la heparina influye en gran medida la estructura de los oligosacáridos correspondientes. Además, cada reacción de despolimerización usada para su preparación presenta su propia selectividad preferente, respecto a secuencias y/o residuos, y también normalmente modifica al menos el monosacárido en el sitio de escisión, generando diversidades estructurales adicionales.

[0005] El documento US 4.987.222 desvela un método para la despolimerización de heparina mediante el uso de rayos γ. Los ejemplos desvelan la preparación de heparina con un peso molecular promedio en peso (P_m) de aproximadamente 5.000 Da y con un alto contenido de S. La patente muestra una relación directa entre la cantidad de radiación y la reducción en el P_m. Sin embargo, el uso de radiación de acuerdo con el documento US 4.987.222 hace posible solo una reducción limitada en el P_m de heparina. Una vez se supera un cierto valor de radiación, el color se oscurece.

[0006] La degradación de heparina por rayos γ se reduce en gran medida cuando se irradia heparina en presencia de un compuesto orgánico, como enseña el documento WO 03/O76474. La heparina despolimerizada obtenida es de color claro y no requiere procedimientos de decoloración.

[0007] Sorprendentemente, se ha encontrado que combinando al menos dos procedimientos de irradiación por rayos γ y con procedimientos de separación, es posible obtener oligosacáridos derivados de heparina que tienen propiedades únicas.

Descripción resumida de la invención

[0008] La presente invención se refiere a un procedimiento multietapa para la despolimerización física de heparina caracterizado por el uso de al menos dos etapas de irradiación con rayos γ y en el que se realiza una etapa de separación entre dos etapas de irradiación y solo una fracción de la heparina despolimerizada se somete a la etapa

de irradiación posterior.

[0009] También se refiere a diversos tipos de oligosacáridos derivados de heparina (HO) que pueden obtenerse mediante este procedimiento.

5

Descripción detallada de la invención

[0010] La presente invención se refiere a un procedimiento multietapa para la despolimerización física de heparina, en el que la heparina se somete a al menos dos irradiaciones con rayos γ y en el que entre dos etapas de irradiación la heparina despolimerizada se somete a una etapa de separación. Sólo una fracción de la heparina despolimerizada se somete a la siguiente etapa de irradiación.

[0011] El procedimiento puede repetirse de nuevo hasta un total de 3 o más etapas de irradiación.

15 **[0012]** La etapa de separación puede ser cualquier etapa de separación conocida en la técnica, por ejemplo cromatografía de permeación en gel, que separa las diferentes fracciones por peso molecular, cromatografía de intercambio de iones, que separa las fracciones por densidad de carga, ultrafiltración y precipitación usando iones mono o divalentes.

20 **[0013]** Preferentemente, entre dos etapas de irradiación, se usa una cromatografía de permeación en gel y la fracción sometida a irradiación adicional es la fracción de alto peso molecular. Después de la última etapa de irradiación, es posible usar cromatografía de permeación en gel y/o cromatografía de intercambio de iones.

25 **[0014]** Preferentemente, el procedimiento multietapa de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas: someter una solución de heparina a una primera etapa de despolimerización por rayos γ ; someter los oligosacáridos derivados de heparina obtenidos a separación por cromatografía de permeación en gel, para aislar una fracción de alto peso molecular; someter la fracción de alto peso molecular a un segundo tratamiento por rayos γ ; someter los oligosacáridos derivados de heparina obtenidos a una separación por cromatografía de permeación en gel para aislar una fracción que tiene un P_m comprendido entre 1.300 y 3.000 Da, preferentemente entre 1.800 y 30 2.800 Da. Más preferentemente, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende adicionalmente una tercera etapa de irradiación y separación, más preferentemente comprende también una cuarta etapa de irradiación y separación.

35 **[0015]** En una realización adicional, la invención se refiere a una diversidad de fracciones HO que pueden obtenerse de acuerdo con el procedimiento de la invención y que son útiles como un producto con actividad farmacológica potencial, o como un intermedio en la preparación de un compuesto farmacológico activo.

40 **[0016]** Una fracción obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención está caracterizada por un P_m comprendido entre 1.200 y 3.000 Da, preferentemente entre 1.800 y 2.800 Da, y una concentración de ácido β -D-glucurónico según se mide por RMN de ^1H igual a o menor de 19%, preferentemente igual a o menor de 17%, más preferentemente igual a o menor de 16%.

[0017] Estos oligosacáridos están enriquecidos en las secuencias sulfatadas I, es decir, I_{2S} y $A_{NS,6S}$.

45 **[0018]** Otra fracción objeto de la invención tiene un contenido de N-acetil glucosamina igual a o mayor de 20%, preferentemente igual a o mayor de 22%, un contenido de $A_{NS,3S,6S}$ mayor de 4%, y un P_m comprendido entre 3.500 y 10.000 Da.

50 **[0019]** Estas características hacen a la estructura tipo heparansulfato y, de esta manera, potencialmente de alto interés práctico.

[0020] Una fracción adicional que puede obtenerse de acuerdo con la invención tiene un contenido de $A_{NS,3S,6S}$ mayor de 8% y un P_m comprendido entre 1.200 y 3.000 Da, preferentemente entre 1.800 y 2.800 Da.

55 **[0021]** El procedimiento de acuerdo con la invención se realiza preferentemente sometiendo la heparina a un primer tratamiento con rayos γ , seguido de separación de la fracción de alto peso molecular de la fracción de bajo peso molecular. La fracción de alto peso molecular se irradia de nuevo con rayos γ .

60 **[0022]** Más preferentemente el procedimiento de irradiación y separación se repite una tercera y opcionalmente una cuarta vez.

[0023] Se ha encontrado que, cuando se comparan HO que tienen un P_m similar pero que experimentaron un número diferente de etapas de irradiación, cuanto mayor sea el número de irradiaciones menor es la concentración de unidades G.

65

[0024] Sin desear quedar ligado a teoría alguna, es posible que la degradación de la cadena de heparina por los rayos γ degrade predominantemente las unidades G.

[0025] Al mismo tiempo, la concentración de grupos $A_{NS,3S,6S}$ no disminuye, indicando que el oligosacárido obtenido por el procedimiento mantiene su actividad hacia antitrombina III, mientras disminuye la concentración de los grupos G no sulfatados.

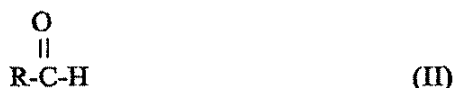
[0026] La radiación gamma se obtiene preferentemente a partir de las siguientes fuentes: ^{60}Co , ^{241}Am , ^{137}Cs y ^{226}Ra ; la radiación γ más preferida es la obtenida de ^{60}Co como una fuente. El ^{60}Co tiene un tiempo de semivida de 5,3 años y emite dos fotones con una energía de 1,17 y 1,33 MeV.

[0027] La cantidad de radiación usada en el procedimiento de despolimerización depende de diversos factores: el P_m inicial de la heparina, el P_m final deseado, la cantidad y tipo de compuesto orgánico usado. De hecho, un aumento en la cantidad de compuesto orgánico requiere un aumento en la cantidad de irradiación para obtener la misma reducción de P_m .

[0028] En general, la cantidad de radiación usada en cada etapa de despolimerización variará en el intervalo 50-300 kGy, preferentemente 80-250 kGy, más preferentemente 100-200 kGy.

[0029] La etapa de irradiación se realiza preferentemente en presencia de un compuesto orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en alcoholes, éteres, aldehídos, amidas y ácido fórmico.

[0030] Preferentemente, el compuesto orgánico se selecciona entre compuestos de fórmula I, II y III.



en las que cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, CHO, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ y acilo, opcionalmente sustituido con átomos de oxígeno; dos grupos R opcionalmente se unen juntos para formar un anillo.

[0031] Los ejemplos preferidos de alcoholes son: metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, glicerol.

[0032] Los ejemplos preferidos de éteres son: tetrahydrofurano, dioxano, dietiléter, tercbutilmetiléter, dioxolano.

[0033] Los ejemplos de aldehídos son formaldehído, glioxal, acetaldehído o formas estabilizadas de los mismos (trioxano, glioxal trimérico dihidrato).

[0034] Los ejemplos preferidos de amidas son: N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N,N-dietilformamida, N-metilpirrolidona.

[0035] La concentración de heparina en la solución que se va a someter a irradiación puede variar en un amplio intervalo. Preferentemente, está comprendida entre el 2 y el 25% p/v, más preferentemente entre el 5 y el 15%.

[0036] La cantidad de compuesto orgánico de acuerdo con la invención depende de diversos parámetros, aunque generalmente está comprendida entre el 0,1 y el 5% (v/v). Cuando se usa una cantidad de radiación de hasta 100 kGy, la cantidad preferida de compuesto orgánico está comprendida entre el 0,1 y el 1%, mientras que en el caso de que la cantidad de radiación sea mayor de 100kGy, la cantidad preferida de compuesto orgánico está comprendida entre el 0,2 y el 2%.

50 Parte experimental

Irradiación con rayos gamma

[0037] El sistema que transporta los productos alrededor de la fuente es de tipo "multi-pasada": los recipientes pasan un número de veces que es directamente proporcional a la dosis a la que se va a someter el producto.

[0038] Durante cada pasada el producto recibe una dosis de aproximadamente 25 kGy.

[0039] El tiempo que tarda en completarse la ruta una vez depende de la potencia (o actividad) de la fuente radiactiva; se ajusta periódicamente siguiendo la desintegración natural de la fuente, o teniendo en cuenta adiciones
5 de isótopo radiactivo.

Caracterizaciones de productos

[0040] La masa molecular (P_m y M_n) se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño (European
10 Pharmacopoeia 4ª ed.: 2.2.30 y 2.2.46 para técnicas de cromatografía y 01/2002:0828 pág. 1297 para el método).

[0041] La absorbancia a 260 y 400 nm se determinó de acuerdo con la European Pharmacopoeia 4ª ed
01/2002:0828 pág.1297.

15 [0042] La actividad anti Xa se determinó de acuerdo con el método descrito en la European Pharmacopoeia 4ª ed.: 2.2.30 y 2.2.46 para las técnicas de cromatografía y 01/2002:0828 pág.1297 para el método.

[0043] *Espectros de RMN* - Los espectros de protones se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Avance a 500 MHz, equipado con una sonda TXI de 5 mm de gradiente, a 60 °C, con presaturación de las señales de agua
20 residuales, retraso de reciclado de 12 segundos y número de exploraciones 128. Las muestras se prepararon disolviendo 10 mg de γ -HO o heparina no fraccionada (UFH) en 0,5 ml de óxido de deuterio (99,99%). La correlación de desplazamiento químico $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) de los espectros se realizó usando los gradientes z para selección de coherencia. Se obtuvieron con desacoplamiento de carbono durante el periodo de adquisición en un modo de absorción puro con potenciación de sensibilidad de fase. Los espectros se adquirieron con un tiempo de anulación
25 de 2 s, 1024 puntos de datos en F2, 512 incrementos en F1, 32 exploraciones por incremento. El tamaño de matriz final era cero cargado a 4Kx2K y multiplicado con seno-campana-cuadrado ($\pi/3$) desplazado antes de la transformada de Fourier. La integración de los volúmenes de pico cruzados se realizó usando un paquete de software Bruker XWIN-NMR 3.1.

30 [0044] Los espectros de carbono se obtuvieron a 100 MHz en un espectrómetro Bruker AMX400 equipado con una sonda de banda ancha de 10 mm a 40 °C. Los protones se desacoplaron durante el tiempo de adquisición. Retraso de reciclado 4 s - número de exploraciones 40.000. Las muestra se prepararon disolviendo 250 mg de UFH o γ -HO en 2,5 ml de óxido de deuterio.

35 [0045] *Cuantificación de los patrones de sulfatación* - El porcentaje de todos los sustituyentes posibles presentes en los anillos de glucosamina o ácido urónico se refirió al área total de glucosamina y las señales de RMN de ^1H de ácido urónico, respectivamente, y se calculó como se ha descrito anteriormente (Guerrini, M., Bisio, A., & Torri, G.: "Combined quantitative ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy for characterization of heparin preparations." Semin. Thromb. Hemost., 27, 473-482, 2001). Además se calculó el contenido de residuos de ácido
40 idurónico 2-O-sulfatados reductores. Puesto que la señal H1 de I_{2S} solo tiene en cuenta los residuos enlazados 1 \rightarrow 4, el porcentaje de I_{2S} en el extremo reductor se determinó a partir de los espectros RMN de ^{13}C : la señal a 95 ppm se integró, se comparó con un 1/2 del área de las señales anoméricas y el porcentaje resultante se tomó en cuenta para el cálculo de la cantidad de I_{2S} obtenido a partir de los espectros de protones. Además, el porcentaje de residuos de glucosamina N-sulfatada (A_{NS}) total, calculado por integración de la señal H2, a 3,3 ppm, se dividió en
45 A_{NS} unido a ácido idurónico (A_{NS-I}) y A_{NS} unido a ácido glucurónico (A_{NS-G}). Este último se cuantificó integrando su señal de protones anoméricos a 5,6 ppm, mientras que A_{NS-I} se determinó por la diferencia entre el A_{NS} total y el H1 de A_{NS-G} .

[0046] *Materiales* - Las heparinas de mucosa de cerdo eran preparaciones comerciales de heparina no
50 fraccionada (UFH) como sal sódica de Laboratori Derivati Organici. Se obtuvo Sephadex G50[®] de Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia. Las columnas TSK eran de Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU. La antitrombina humana, factor bovino Xa y sustrato sintético S-2765 eran de Chromogenix (Möln dal, Suecia). Todos los demás reactivos y productos químicos eran de calidad para investigación.

55 Ejemplo 1

[0047] Una solución acuosa de heparina de mucosa de cerdo (10% p/v), en presencia de 0,4% (v/v) de isopropanol y en atmósfera de nitrógeno, se sometió a radiación ionizante (180-200 kGy). La mezcla de heparina despolimerizada se sometió a un tratamiento de blanqueo con agentes oxidantes, de acuerdo con procedimientos
60 industriales típicos para preparaciones de heparina y después se sometió a cromatografía de permeación en gel en una columna Sephadex G50 para separar las especies de mayor (H, $P_m > 3.500$ Da) y menor (L, $P_m < 1.800$ Da) peso molecular y aislar una fracción intermedia (γ -HO, $P_m = 1.800$ -2.800 Da). La fracción H, separada de γ -HO-a se recuperó y volvió a someterse a tratamiento por rayos y seguido de fraccionamiento cromatográfico en gel en las mismas condiciones que antes, obteniendo las fracciones H2, HOa2 y L2. Después, la fracción H2 se trató de nuevo
65 con rayos y se fraccionó como en el caso anterior, produciendo las fracciones H3, HO-a3 y L3.

[0048] Todas las γ -HO diferentes analizadas, preparadas en presencia de isopropanol y tanto con un solo (γ -HO-a) o adicionales (γ -HO-a2 y γ -HO-a3) tratamiento con rayos γ , presentaron perfiles de elución de HPLC comparables y simétricos. Sus valores de polidispersidad se muestran en la Tabla 2, junto con su actividad anticoagulante (anti Xa) *in vitro* resultante, en comparación con los valores correspondientes de UFH típicos.

5

Tabla 1

muestra	Pd	Actividad anti-Xa (U/mg)
UFH	1,28	190
γ -HO-a	1,28	43
γ -HO-a2	1,30	35
γ -HO-a3	1,25	34

[0049] Los perfiles de los espectros ^{13}C y ^1H de oligosacáridos son similares a los de la heparina precursora, con las diferencias inducidas típicamente por la despolimerización, tan generales como aumento de la señal, debido a la viscosidad reducida, y resonancias más fuertes asociadas con los extremos de cadena y efectos sobre la secuencia. Por ejemplo, las nuevas señales a 93 y 95 ppm en el espectro ^{13}C de γ -HO, se atribuyen a los carbonos anoméricos de la reducción de glucosamina N,6-sulfatada y los residuos de ácido idurónico 2-sulfatados, respectivamente.

10

[0050] A partir de la comparación de los espectros de protones de γ -HO y heparina precursora aparecen algunas diversidades. La diferencia principal se debe al impresionante aumento de la intensidad de la señal de H4 del residuo de glucosamina N,6-sulfatada no reductor a 3,56 ppm. Otras diferencias se deben a los residuos de extremo reductor: por ejemplo las resonancias de H2 a aproximadamente 3,1 y 3,2 ppm de los anómeros β de A_{NS} y G respectivamente, mientras que la resonancia de H1 a 5,44 ppm es del anómero α de A_{NS} .

15

[0051] Un método que combina análisis cuantitativo ^1H y ^{13}C de las señales mayoritarias y algunas minoritarias, originalmente establecido para las UFH, se ha aplicado para muestras de γ -HO para estimar su patrón de sulfatación. El porcentaje de sustitución de glucosamina y residuos de ácido urónico de las tres fracciones γ -HO obtenidas en las diferentes etapas del ejemplo 1 se presentan en la Tabla 2, en comparación con los valores medios obtenidos a partir de diez preparaciones de heparina de mucosa de cerdo no fraccionada.

20

Tabla 2

muestra	A_{NS-I}	A_{NS-G}	A_{NAC}	$A_{NS,3S,6S}$	A_{6S}^a	I_{2S}	I_{2OH}	G
UFH-a	69	10	15	5	86	59	12	29
γ -HO-a	69	8	16	6	81	67 (5) ^b	11	21
γ -HO-a2	71	9	14	6	84	70 (5) ^b	11	19
γ -HO-a3	73	9	11	6	90	75 (4) ^b	10	16

^a Valores obtenidos por integración de señales de RMN de ^{13}C .

^b Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de residuos de ácido idurónico 2-O-sulfatado reductores, cantidades que están incluidas en los valores de porcentaje de I_{2S} .

25

Ejemplo 2

[0052] Se repitió el ejemplo 1 añadiendo una cuarta etapa de irradiación. Se analizó la composición de alto P_m (H3) y P_m intermedio (γ -HO-a3) después de la tercera irradiación y separación y los resultados se presentan en la Tabla 3. H3 se sometió a una cuarta irradiación y se presenta la composición del producto crudo obtenido.

30

Tabla 3

	A_{NS-I}	A_{NS-G}	A_{NAC}	$A_{NS,3S,6S}$	A_{6S}^*	I_{2S}	I_{2OH}	I_{2S-red}	G
H3	59,9	8,3	27,1	4,7	91,3	67,2	10	-	19,6
γ -HO-a3	74,2	8,2	12,4	5,4	90,5	66,1	15,9	0,46	18,1
4 ^a γ crudo	69,5	10,9	13,3	6,4	90,8	72,5	13,7	3,32	13,8

Ejemplo 3

[0053] Se repitió el ejemplo 1 pero la fracción γ -HO-a3 se sometió adicionalmente a cromatografía de intercambio de iones de acuerdo con el siguiente procedimiento.

35

[0054] Se disolvieron 500 mg de γ -HO-a3 en solución de equilibrado, NH_4Cl 0,05 M pH 7,4, cargada en una columna QAE-Sephadex A25-120 (2,5 x 5 cm) y se fraccionaron en cuatro fracciones eluyendo con una concentración en aumento gradual de NaCl (0,4, 0,6, 0,7, 0,8, 1,0 y 2,0 M) en 60 ml de solución de equilibrado, a un

40

ES 2 390 137 T3

caudal de 0,8 ml/min. Las fracciones correspondientes γ -HO-a3-0,4, γ -HO-a3-0,6, γ -HO-a3-0,7, γ -HO-a3-0,8, γ -HO-a3-1,0 y γ -HO-a3-2,0, se desalaron por cromatografía de permeación en gel en Sephadex G10 y se analizaron para el contenido de ácido urónico por reacción con carbazol; sus rendimientos fueron 2, 9, 56, 19, 13 y 1%, respectivamente.

5

[0055] Los datos analíticos de la fracción γ -HO-a3-1,0 son:

A_{NS-I}	A_{NS-G}	A_{NAC}	A_{NS,3S,6S}	A_{6S}*	I_{2S}	I_{2OH}	I_{2S-red}	G
63,6	16,5	8,4	11,4	nd	73,1	8,5	nd	18,4

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento multietapa para la despolimerización física de heparina en el que la heparina se somete a al menos dos irradiaciones con rayos γ y en el que entre dos etapas de irradiación la heparina despolimerizada se somete a una etapa de separación y solo una fracción de la heparina despolimerizada obtenida de la primera irradiación se somete a la segunda etapa de irradiación.
2. Procedimiento multietapa de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
 - 10 someter una solución de heparina a una primera etapa de despolimerización por rayos γ ;
 - someter los oligosacáridos derivados de heparina obtenidos a separación por cromatografía de permeación en gel, para aislar una fracción de alto peso molecular;
 - someter la fracción de alto peso molecular a un segundo tratamiento con rayos γ ;
 - 15 someter los oligosacáridos derivados de heparina obtenidos a separación por cromatografía de permeación en gel para aislar una fracción que tiene un P_m comprendido entre 1.200 y 3.000 Da, preferentemente entre 1.800 y 2.800 Da.
3. Procedimiento multietapa de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende adicionalmente una tercera etapa de irradiación y separación.
- 20 4. Procedimiento multietapa de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende adicionalmente una cuarta etapa de irradiación y separación.
5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2-4 en el que la fracción de oligosacáridos derivados de heparina que tienen un P_m comprendido entre 1.800 y 2.800 Da obtenida después de la última cromatografía de permeación en gel se somete adicionalmente a cromatografía de intercambio iónico, para aislar fracciones que tienen diferente densidad de carga.
- 25 6. Procedimiento multietapa de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 en el que la irradiación con rayos γ se realiza en presencia de un compuesto orgánico seleccionado del grupo que consiste en alcoholes, éteres, aldehídos, amidas y ácido fórmico.
- 30 7. Procedimiento multietapa de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el compuesto orgánico es isopropanol y se usa en una concentración del 0,1 al 5% (v/v).
- 35 8. Procedimiento multietapa de acuerdo con las reivindicaciones 1-7 en el que en cada etapa de despolimerización se da una dosis de radiación comprendida entre 50 y 300 kGy.
9. Procedimiento multietapa de acuerdo con las reivindicaciones 1-8 en el que la fracción de oligosacáridos de heparina despolimerizada sometida a la siguiente etapa de irradiación tiene un $P_m > 3.500$ D.
- 40 10. Heparina despolimerizada que tiene un P_m comprendido entre 1.200 y 3.000 Da y una concentración de ácido β -D-glucurónico según se mide por RMN- 1H igual a o menor de 19 %.
- 45 11. Heparina despolimerizada que tiene un contenido en N-acetil glucosamina igual a o mayor de 20%, preferentemente igual a o mayor de 22%, un P_m comprendido entre 3.500 y 10.000 Da, y un contenido de $A_{NS,3S,6S}$ mayor de 4 %.
- 50 12. Heparina despolimerizada que tiene un contenido de $A_{NS,3S,6S}$ mayor de 8% y un P_m comprendido entre 1.200 y 3.000 Da.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 4987222 A [0005]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- 15 • European Pharmacopoeia. January 2002, 1297 [0040] [0041] [0042] • **Guerrini, M. ; Bisio, A. ; Torri, G.** Combined quantitative H and C nuclear magnetic resonance spectroscopy for characterization of heparin preparations. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2001, vol. 27, 473-482 [0045]