

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 102**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/527 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2003 E 03772376 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1558755**

54 Título: **Método de determinación de grupos específicos que constituyen las heparinas o las heparinas de bajo peso molecular**

30 Prioridad:

23.09.2002 FR 0211724
31.10.2002 US 422482 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2013

73 Titular/es:

AVENTIS PHARMA S.A. (100.0%)
20, AVENUE RAYMOND ARON
92160 ANTONY, FR

72 Inventor/es:

MOURIER, PIERRE y
VISKOV, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 102 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).

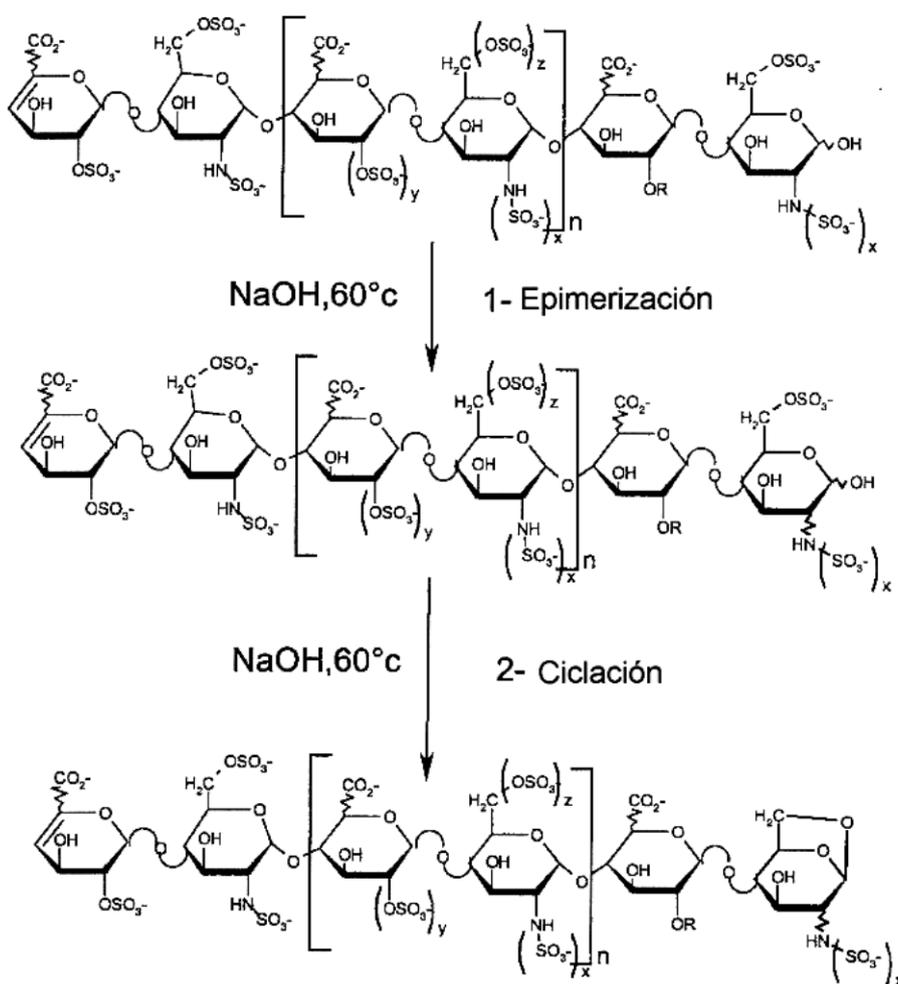
DESCRIPCIÓN

Método de determinación de grupos específicos que constituyen las heparinas o las heparinas de bajo peso molecular

5 La presente invención tiene por objeto un método de análisis de grupos específicos que constituyen las heparinas o las heparinas de bajo peso molecular.

Durante el procedimiento de preparación de la Enoxaparina (Lovenox®) (US 5.389.618) a partir de la heparina pura, la etapa del procedimiento de despolimerización alcalina en fase acuosa produce una transformación parcial, pero característica de las glucosaminas de las terminaciones reductoras de las cadenas oligosacáridas.

10 La primera etapa de esta transformación consiste en una epimerización glucosamina↔manosamina (T. Toida and al, J. Carbohydrate Chemistry, 15(3), 351-360 (1996)); la segunda etapa es una 6-O desulfatación de la glucosamina que conduce a la formación de derivados denominados « 1,6 anhidro » (solicitud de patente internacional WO01/29055).



Este tipo de derivado solo se obtiene para las cadenas oligosacáridas cuya glucosamina terminal está 6-O sulfatada.

15 El porcentaje de cadenas oligosacáridas cuya terminación está modificada por un enlace 1,6-anhidro es una característica estructural de la mezcla de oligosacáridos de Lovenox y debe poder medirse.

La presente invención consiste por lo tanto en un método de análisis de las heparinas, de las heparinas de bajo peso molecular y más particularmente de Lovenox.

El método de análisis según la invención es el siguiente:

20 La muestra que se va a dosificar se despolimeriza por acción de heparinasas, después si procede el despolimerizado obtenido se reduce, después se efectúa un análisis por cromatografía líquida de alta resolución.

El método tal como se define más arriba por lo tanto se caracteriza en que se busca la presencia de cadenas oligosacáridas cuya terminación está modificada por un enlace 1,6-anhidro (« Grupos 1,6 anhidro »).

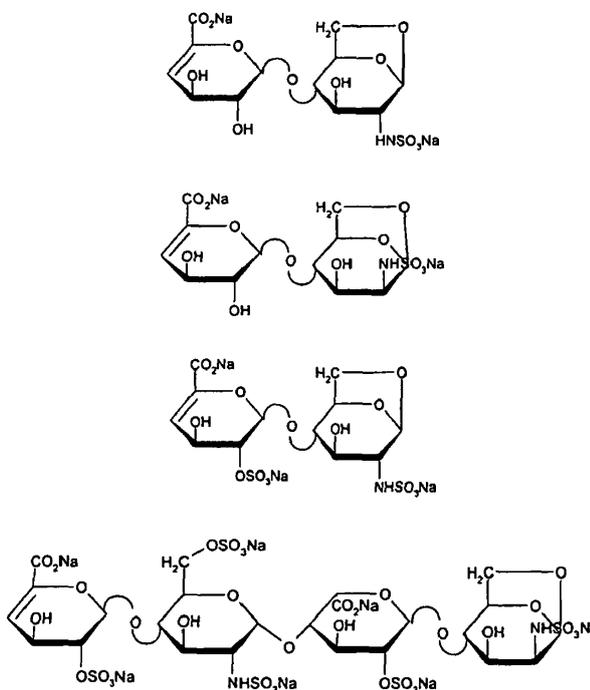
En particular, la muestra que se va a dosificar en primer lugar se despolimeriza de forma exhaustiva con una mezcla de heparinasas y particularmente de heparinasa 1 (EC 4.2.2.7.), de heparinasa 2 (heparin Liasa II) y de heparinasa 3 (EC4.2.2.8.)). (Estas enzimas son comercializadas por la compañía Grampian Enzymes). La solicitud internacional W088/02400 describe un método de despolimerización de la heparina por una heparinasa y neutralización de la actividad anticoagulante de la heparina contenida en una muestra sanguínea.

La invención tiene por lo tanto por objeto un método de análisis de heparinas o de heparinas de bajo peso molecular para buscar la presencia de cadenas oligosacáridas cuya terminación está modificada por un enlace 1,6-anhidro, caracterizado por que se efectúan las siguientes etapas :

- 1) despolimerización de la muestra por acción de las heparinasas,
- 2) reducción del despolimerizado,
- 3) dosificación por cromatografía líquida de alta resolución, el método de cromatografía utilizado que es una cromatografía por intercambio de aniones para la determinación de los grupos 1,6-anhidro, en la que :

- se utiliza una fase móvil transparente en el UV hasta 200 nm y
- una doble detección a 234 nm por una parte y 202-230nm por otra parte que permite detectar selectivamente los azúcares acetilados, efectuándose dicho método tomando como señal, para la detección selectiva de los azúcares acetilados, la diferencia entre la absorbancia a estas 2 longitudes de onda (202 y 230 nm) elegidas de tal manera que la absorptividad de los sacáridos no acetilados se anula,

y caracterizada por que los residuos 1,6-anhidro obtenidos durante la reacción de despolimerización son los siguientes :



las heparinasas están en forma de una mezcla de heparinasa 1 (EC 4.2.2.7.), de heparinasa 2 (heparin liasa II) y de heparinasa 3 (EC.4.2.2.8.)

El despolimerizado así preparado se trata a continuación de preferencia con una disolución de NaBH₄ en acetato de sodio. Esta última operación permite reducir específicamente las extremidades reductoras que no están en la forma 1,6 anhidro (productos descritos en la solicitud de patente internacional WO 01/72762). Por último, para poder cuantificar los disacáridos 1 y 2 descritos más arriba, la muestra de heparina de bajo peso molecular, despolimerizada por las heparinasas, debe reducirse por la acción de un agente reductor tal como NaBH₄.

La invención tiene por tanto más particularmente por objeto el método tal como se define más arriba, caracterizado por que la heparina despolimerizada se reduce a continuación.

5 La invención tiene más particularmente por objeto el método tal como se define anteriormente caracterizado por que el agente de reducción es NaBH₄. Se podrá opcionalmente utilizar otra sal de metal alcalino de borohidruro tal como litio o potasio.

La dosificación de las terminaciones 1,6 anhidro se realiza a continuación por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta resolución) y en particular por cromatografía de intercambio de aniones.

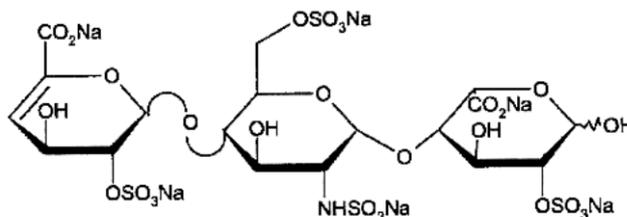
10 El método de dosificación según la invención permite diferenciar bien el Lovenox de las otras heparinas de bajo peso molecular que no contienen estos derivados « 1,6-anhidro ». A la inversa, el método de dosificación según la invención permite asegurarse de que las heparinas de bajo peso molecular no reúnen las características físico-químicas del Lovenox y por lo tanto son de naturaleza diferente.

El método de dosificación según la invención puede aplicarse al procedimiento industrial en los controles de muestras durante el procedimiento, para asegurar una estandarización del procedimiento de fabricación del Lovenox y obtener lotes uniformes.

15 Después de la despolimerización enzimática y reducción de las extremidades reductora, se encuentran los derivados 1,6-anhidro del Lovenox en 4 formas esenciales.

20 Todos los oligosacáridos o polisacáridos que comprenden el extremo 1,6-anhidro sobre la unidad disacáridica terminal y que no poseen un 2-O sulfato sobre el ácido urónico de dicho disacárido terminal, son totalmente despolimerizados por las heparinasas y en la forma de los disacáridos 1 y 2. Por el contrario, cuando dicho sacárido terminal comprende un 2-O sulfato sobre el ácido urónico y está en la forma manosamina, el derivado 1,6 anhidro se encuentra en la forma de tetrasacárido 1 (forma resistente a las heparinasas).

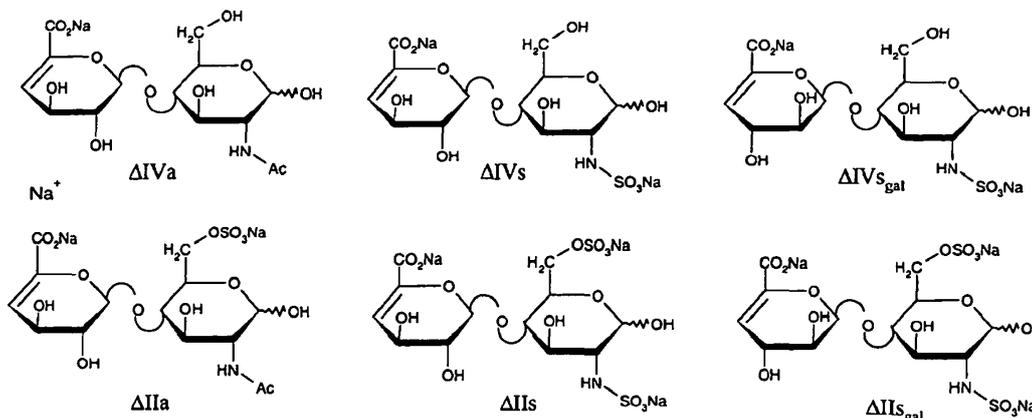
El trisacárido 1 (véase más abajo), está igualmente presente en la mezcla. Procede de otro proceso de degradación que conduce a la estructura a continuación (fenómeno de separación observado en la despolimerización química del Lovenox).



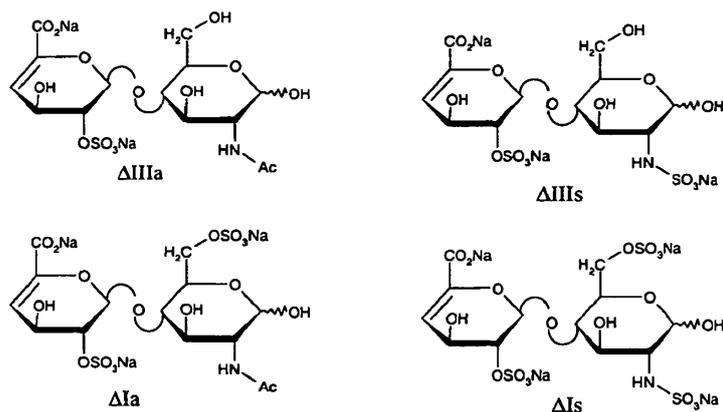
25 trisacárido 1

Los otros constituyentes de la mezcla no son característicos únicamente del Lovenox. Existen por supuesto los 8 disacáridos elementales de la cadena heparínica. Estos 8 disacáridos elementales son comercializados entre otros por la compañía Sigma.

30 Se han identificado en la mezcla otros disacáridos por el método según la invención: los disacáridos ΔIIs_{gal} y ΔIVs_{gal} que tiene como origen la 2-O desulfatación alcalina de -IdoA(2S)-GlcNS(6S)- y de -IdoA(2S)-GlcNS- que conduce a la formación de 2 ácidos galacturónicos. No están presentes habitualmente en la estructura original de la heparina (U.M. Desai et Coll. Arch. Biochem. Biophys., 306 (2) 461-468 (1993).

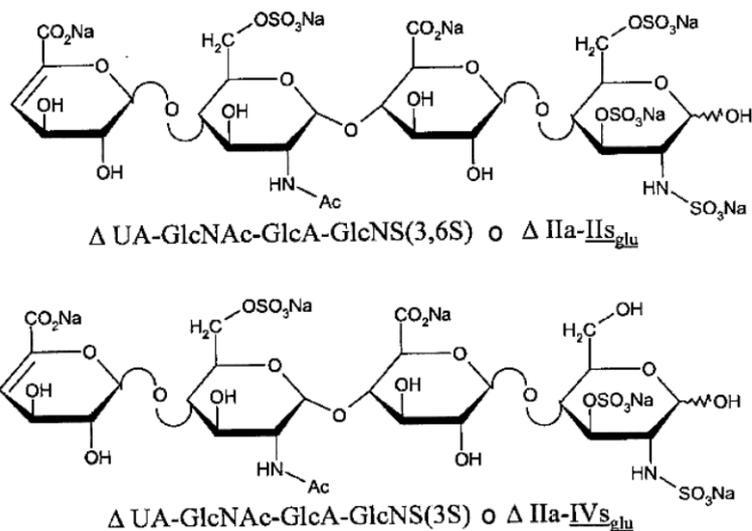


35

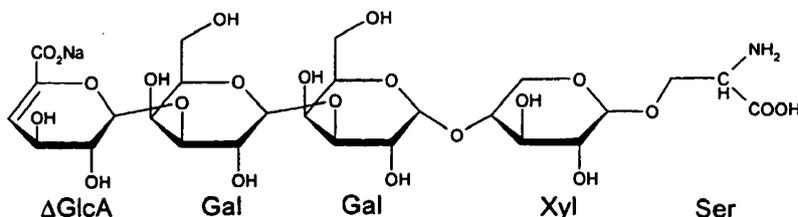


Los oligosacáridos que comprenden glucosaminas 3-O sulfatadas resisten a la escisión por las heparinasas y permanecen presentes en forma de tetrasacáridos.

- 5 En el caso de la mayoría de las heparinas de bajo peso molecular, la heparina se extrae de la mucosidad porcina, y estos tetrasacáridos principales están representados más abajo. Son resistentes a la despolimerización enzimática y son el reflejo de las secuencias afines a la antitrombina III. Se simbolizan así : Δ Ila-IIs_{glu} y Δ Ila-IVs_{glu}. (S.YAMADA, K.YOSHIDA, M. SUGIURA, K.SUGAHARA, K-H KHOO, H.R. MORRIS, A. DELL, J.Biol.Chem. ; 270(7), 4780-4787 (1993))



- 10 El último constituyentes de la mezcla escindida por las heparinasas es la terminación glicosericina Δ GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser (K.SUGAHARA, H.TSUDA, K.YOSHIDA, S.YAMADA, J.Biol.Chem. ; 270(39), 22914-22923 (1995) ; K.SUGAHARA, S.YAMADA, K.YOSHIDA, P. de WAARD, J.F.G. VLIAGENTHART ; J.Biol.Chem. ; 267(3), 1528-1533 (1992). Está último está generalmente casi ausente del Lovenox (Véase RMN en el ejemplo 5).



- 15 Otro aspecto de la invención se sitúa a nivel del procedimiento de cromatografía utilizado para la determinación de los grupos 1,6-anhidro. En principio se trata de separar los diferentes polisacáridos obtenidos después de la despolimerización y tratamiento con un agente reductor tal como NaBH_4 .

La cromatografía de intercambio de aniones (SAX) es el método separativo más adaptado a tal mezcla compleja.

- 20 Se pueden utilizar columnas llenas de una fase estacionaria del tipo Spherisorb SAX de granulometría 5 μm y de una longitud de 25 cm. Son utilizables todos los diámetros de columna clásicos comprendidos entre 1mm y 4,6 mm.

- El equipo puede ser una cromatógrafo que permita la formación de gradiente de elución con un detector UV, más preferiblemente provisto de una barra de diodos para poder realizar los espectros UV de los constituyentes y de registrar las señales complejas que resultan de la diferencia entre las absorbancias a 2 longitudes de onda diferentes y que permitan la detección específica de los oligosacáridos acetilados. Para permitir este tipo de detección, son preferibles fases móviles transparentes en el UV hasta 200 nm. Esto excluye las fases móviles clásicas a base de NaCl que además tienen el inconveniente de necesitar un cromatograma pasivado para resistir al poder corrosivo de los cloruros. La fase móvil utilizada aquí será preferentemente a base de una disolución de perclorato de sodio, pero pueden utilizarse también sales de metano sulfonato o fosfato.
- 5
- El pH preconizado para la separación es de 2 a 6,5. Preferentemente, se utilizará un pH próximo a 3. Se controla por la adición de una sal tal como el fosfato que posee un poder tampón a pH = 3 mejor que el de los percloratos.
- 10

A título de ejemplo, se proporcionan a continuación las condiciones estándar de separación cromatográfica:

Disolvente A: NaH_2PO_4 2,5 mM llevado a pH 2,9 por adición de H_3PO_4

Disolvente B: NaClO_4 1N - NaH_2PO_4 2,5 mM llevado a pH 3,0 por adición de H_3PO_4

El gradiente de elución puede ser el siguiente:

- 15 $T = 0 \text{ min} : \%B = 3 ; T = 40 \text{ min} : \%B = 60 ; T = 60 \text{ min} : \%B = 80$

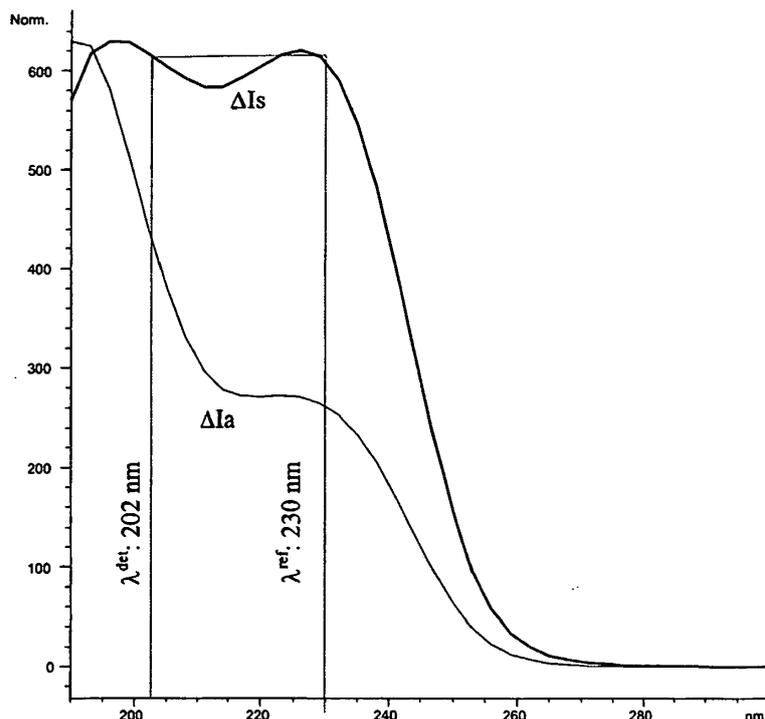
La presente invención tiene por lo tanto igualmente por objeto un método de análisis tal como se define más arriba por separación por cromatografía por intercambio de aniones caracterizado por que se utiliza la fase móvil transparente en el UV hasta 200nm.

- 20 La invención tiene más particularmente por objeto una fase móvil tal como se define más arriba a base de perclorato de sodio, de sales de metano sulfonato o de sales de fosfato.

Otro aspecto bastante importante se encuentra en el método de detección.

- 25 Se ha desarrollado un método para aumentar la especificidad de la detección UV. Como los polisacáridos no acetilados tienen todos, a un pH dado, un espectro UV casi idéntico, es posible detectar selectivamente los azúcares acetilados tomando como señal la diferencia entre la absorbancia a dos longitudes de onda elegidas de tal forma que la absorptividad de los sacáridos no acetilados se anula.2

- 30 En el caso anterior, se elegirá 202 nm y 230 nm como longitudes de onda de detección y de referencia y se anotará la señal 202 – 230 nm. La elección es por supuesto dependiente del pH de la fase móvil (pueden ser necesarios ajustes de algunos nm para estar en lo más óptimo de dichas condiciones). El detector más adaptado a esta técnica es el detector DAD 1100 de la compañía Agilent Technologies. En este caso, se realizará una doble detección a 234 nm por una parte, y a 202-230 nm por otra parte. El principio de detección selectiva de los oligosacáridos acetilados se ilustra en la figura más abajo en la que se compara el espectro UV de un disacárido sulfatado Delta 1s con el de un disacárido acetilado Delta 1a



La presente invención tiene por lo tanto igualmente por objeto un método de análisis tal como se define más arriba por separación por cromatografía por intercambio de aniones caracterizado por que el método de detección permite detectar selectivamente los azúcares acetilados.

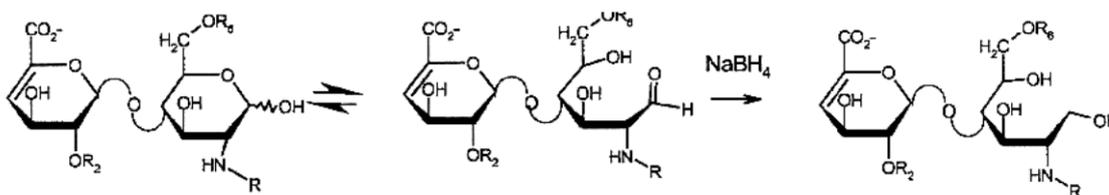
- 5 La invención tiene igualmente más particularmente por objeto un método de análisis tal como se define más arriba por separación por cromatografía por intercambio caracterizado por que la detección selectiva de los azúcares acetilados se efectúa tomando como señal la diferencia entre la absorbancia a 2 longitudes de onda elegidos de tal manera que la absorbtividad de los sacáridos no acetilados se anula.

- 10 La cuantificación de los 4 residuos 1,6-anhidro descritos más arriba necesita una selectividad suficiente del sistema cromatográfico vis a vis todos los otros constituyentes de la mezcla. Ahora bien, los 2 disacáridos 1 y 2, en general co-eluidos, se resuelven mal con relación a ΔIIa, especialmente cuando este último está presente en la forma de sus 2 anómeros α y β.

- 15 La identidad de los 2 disacáridos 1 y 2 puede verificarse fácilmente porque se forman en algunas horas a temperatura ambiente en una disolución acuosa de ΔIIs llevada a pH 13 por adición de NaOH. Sin embargo, si se utiliza la doble detección, los oligosacáridos acetilados ΔIVa, ΔIIa, ΔIIIa, ΔIa, ΔIIa-IV_{Sglu} y ΔIIa-II_{Sglu} son fácilmente identificables.

Las causas de desdoblamiento de los picos son las formas anómeras por una parte, y en una menor medida la epimerización glucosamina ↔ manosamina parcialmente presente para ΔIIs, ΔIIIs y ΔIs cuando están en posición terminal en la cadena oligosacáridica.

- 20 Para poder cuantificar los disacáridos 1 y 2, la muestra de heparina de bajo peso molecular, despolimerizada por las heparinasas, se reduce por la acción de NaBH₄.



Anómero α + Anómero β

- 25 Esta reducción tiene como ventaja que suprime las anomerías α ↔ β por la abertura del ciclo oligosacáridico terminal. El cromatograma obtenido es más simple ya que las anomerías se suprimen y la reducción de ΔIIa disminuye su retención sobre la columna y permite una dosificación fácil de los disacáridos 1 y 2.

Los ejemplos de cromatogramas descritos en las figuras 1 y 2 a continuación ilustran bien estos fenómenos y las ventajas de este método.

5 Por último, la invención tiene igualmente por objeto los derivados sacarídicos nuevos obtenidos por la realización del procedimiento de despolimerización y de reducción elegidos entre el disacárido 1, el disacárido 2, el disacárido 3 y el disacárido 1.

Los ejemplos anteriores ilustran la invención sin tener, sin embargo, un carácter limitativo

Ejemplo 1:

10 La despolimerización enzimática se realiza durante 48 horas a temperatura ambiente mezclando 50 µl de una disolución a 20 mg/ml de la heparina de bajo peso molecular que se va a dosificar, 200 µl de una disolución 100mM de ácido acético/NaOH a pH 7,0 que contiene 2 mM de acetato de calcio y 1 mg/ml de BSA con 50 µl de la disolución madre de las 3 heparinasas.

15 La reducción se realiza sobre 60µl del producto despolimerizado por las heparinasas añadiendo 10 µl de una disolución de NaBH₄ a 30 g/l en acetato de sodio 100 mM preparado extemporáneamente. Se apreciará que las heparinasas se conservan a - 30°C. Las heparinasas están en disolución tampón y su titulación es de 0,5 UI/ml (Composición de la disolución tampón : disolución acuosa pH 7 de KH₂PO₄ a una concentración 0,01 mol/l y con adición de suero de albúmina bovina (BSA) a 2 mg/ml).

Ejemplo 2:

RMN del Disacárido 3 obtenido según el procedimiento descrito más arriba

20 Espectro protón en D₂O, 400 MHz, T=298K (25°C), δ en ppm: 3,34 (1H, dd, J=7 et 2Hz, H2), 3,72 (1H, t, J=8Hz, H6), 3,90 (1H, m, H3), 4,03 (1H, s, H4), 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6), 4,23 (1H, t, J=5Hz, H3'), 4,58 (1H, m, H2'), 4,78 (1H, m, H5), 5,50 (1H, s, H1), 5,60 (1H, dd, J=6 y 1Hz, H1'), 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4').

Ejemplo 3

RMN del Tetrasacárido 1 obtenido según el procedimiento descrito más arriba.

25 Espectro protón en D₂O, 400 MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2), 3,25 (1H, m, H2''), 3,60 (1H, m, H3''), entre 3,70 y 4,70 (14H, masivo, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5', H4''/H5''/H6'', H2'''/H3'''), 4,75 (1H, m, H5), entre 5,20 y 5,40 (2H, m, H1' y H1''), 5,45 (1H, m, H1'''), 5,56 (1H, m, H1), 5,94 (1H, d, J=5Hz, H4)

Ejemplo 4 :

RMN del Trisacárido 1 obtenido según el procedimiento descrito más arriba.

30 Espectro en D₂O, 600 MHz (δ en ppm) : 3,28 (1H, m), 3,61 (1H, t, 7Hz), 3,79 (1H, t, 7Hz), 3,95 (1H, d, 6Hz), 4,00 (1H, s), 4,20 (1H, m), 4,28 (2H, m), 4,32 (1H, d, 4Hz), 4,41 (1H, s), 4,58 (1H, s), 4,61 (1H, s), 4,90 (1H, s ancho), 5,24 (1H, s), 5,45 (1H, s), 5,95 (1H, s).

Ejemplo 5:

RMN de ΔGlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser

35 Espectro en D₂O, 500 MHz (δ en ppm) : 3,30 (1H, t, 7Hz), 3,34 (1H, t, 8Hz), 3,55 (1H, t, 7Hz), 3,60 (1H, t, 7Hz), entre 3,63 y 3,85 (10H, m), 3,91 (2H, m), 3,96 (1H, dd, 7 et 2Hz), entre 4,02 y 4,10 (3H, m), 4,12 (1H, d, 2Hz), 4,18 (1H, m), 4,40 (1H, d, 6Hz), 4,46 (1H, d, 6Hz), 4,61 (1H, d, 6Hz) , 5,29 (1H, d, 3Hz), 5,85 (1H, d, 3Hz).

Ejemplo 6: Principio de la cuantificación

En el método según la invención, se toma como hipótesis, ampliamente admitida, que todos los oligosacáridos insaturados contenido en la mezcla tienen la misma absortividad molar, igual a 5500 mol⁻¹.l.cm⁻¹.

40 Por lo tanto es posible determinar el porcentaje en peso de todos los constituyentes de la mezcla despolimerizada en heparina de bajo peso molecular de partida. Para los 4 derivados 1,6 anhidro que corresponden a los picos 7,8,13 y 19, se obtienen los porcentajes en peso siguientes:

ES 2 398 102 T3

$$\%p/p_{7+8} = 100. \frac{443. (Area_7 + Area_8)}{\sum Mw_x \cdot Area_x} ;$$

5

$$\%p/p_{13} = 100. \frac{545. Area_{13}}{\sum Mw_x \cdot Area_x}$$

10

$$\%p/p_{19} = 100. \frac{1210. Area_{13}}{\sum Mw_x \cdot Area_x}$$

15 Area₇, Area₈, Area₁₃ y Area₁₉ corresponden a las áreas de cada uno de los picos 7,8,13 y 19. Las masas moleculares de cada uno de estos 4 compuestos son respectivamente 443, 443, 545 y 1210. $\sum Mw_x \cdot Area_x$ corresponde a la relación del área de cada pico del cromatograma por la masa molar del producto correspondiente.

Si M_w es la masa medio de la heparina de bajo peso molecular estudiada, el porcentaje de cadenas oligosacáridicas que terminan en un ciclo 1,6 anhidro se obtiene de la siguiente forma :

Las masas moleculares de los constituyentes son las siguientes :

Oligosacárido	Oligosacárido después de reducción	Masa molecular
1	1	741
2	20	401
3	3	734
4	21	461
5	22	461
6	23	503
7	7	443
8	8	443
9	24	503
10	25	563
11	26	563
12	27	563
13	13	545
14	28	605
15	29	1066
16	30	665

ES 2 398 102 T3

Oligosacárido	Oligosacárido después de reducción	Masa molecular
17	31	965
18	32	1168
19	19	1210

Nomenclatura de los sacáridos y correspondencia con los picos según las figuras 1 y 2

IdoA : ácido - α -L-Idopiranosilurónico;

GlcA : : ácido - β -D-Glucopiranosilurónico;

Δ GlcA : ácido 4,5-insaturado : ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-4-enepiranosilurónico

5 Gal : D-Galactosa ;

Xyl : xilosa ;

GlcNAc : 2-deoxi-2-acetamido- α -D-glucopiranososa;

GlcNS : 2-deoxi-2-sulfamido- α -D-glucopiranososa;

2S: 2-O sulfato,

10 3S: 3-O sulfato,

6S : 6-O sulfato

1: Δ GlcA β ₁₋₃ Gal β ₁₋₃ Gal β ₁₋₄ Xyl β ₁-O-Ser

2: ácido 4-desoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido- α -D-glucopiranosil sal de sodio

3 : Δ GlcA β ₁₋₃ Gal β ₁₋₃ Gal β ₁₋₄ Xyl β ₁-O-CH₂-COOH

15 4: ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-4-enegalactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-deoxi-2-sulfamido- β -D-glucopiranososa sal de disodio

5: ácido 4-desoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-deoxi-2-sulfamido- α -D-glucopiranosil sal de disodio

20 6: ácido 4-desoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil sal de disodio

7: ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-4-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfamido- β -D-glucopiranososa sal de disodio (disacárido 1)

8: ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-4-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfamido- β -D-manopiranososa sal de disodio (Disacárido 2)

25 9: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido- α -D-glucopiranosil sal de disodio

10: ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-4-enegalactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-deoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- β -D-glucopiranososa sal de trisodio

ES 2 398 102 T3

- 11: ácido 4-desoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil sal de trisodio
- 12: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido- α -D-glucopiranosil sal de trisodio
- 5 13: ácido 4-deoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-4-enepiranosilurónico- (1 \rightarrow 4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfamido- β -D-glucopiranososa sal de trisodio (Disacárido 3)
- 14: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil sal de trisodio
- 10 15: ácido 4-desoxi - α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido β -D-glucopiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-3-O-sulfo- α -D-glucopiranosil) sal de pentasodio
- 16: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil sal de tetrasodio
- 15 17: ácido 4-desoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido β -D-glucopiranosilurónico-(\rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucopiranosil) sal de hexasodio
- 18: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hexenpiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo-D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido-2-O-sulfo α -L-idopiranosilurónico sal de hexasodio
- 20 19: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido-2-O-sulfo α -L-idopiranosilurónico- (1 \rightarrow 4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfamido- β -D-manopiranososa, sal de heptasodio (tetrasacárido 1)
- 20: ácido 4-desoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido- α -D-glucitol sal de sodio
- 21: ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-4-enegalactopiranosilurónico- (1 \rightarrow 4)- 2-deoxi-2-sulfamido- β -D-glucitol sal de disodio
- 25 22: ácido 4-desoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido- α -D-glucitol sal de disodio
- 23: ácido 4-desoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sal de disodio
- 24: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico- (1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido- α -D-glucitol sal de disodio
- 30 25: ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-4-enegalactopiranosilurónico- (1 \rightarrow 4)- 2-deoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- β -D-glucitol sal de trisodio
- 26: ácido 4-desoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sal de trisodio
- 35 27: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido- α -D-glucitol sal de trisodio
- 28: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico- (1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sal de trisodio
- 29: ácido 4-desoxi - α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido β -D-glucopiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-3-O-sulfo- α -D-glucitol) sal de pentasodio
- 40 30: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico- (1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sal de tetrasodio

31: ácido 4-desoxi - α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido β -D-glucopiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucitol) sal de hexasodio

5 32: ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hexenpiranosilurónico-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido -2-O-sulfo α -L-idopiranosilurónico sal de hexasodio (forma reducida por NaBH₄).

Figura 1

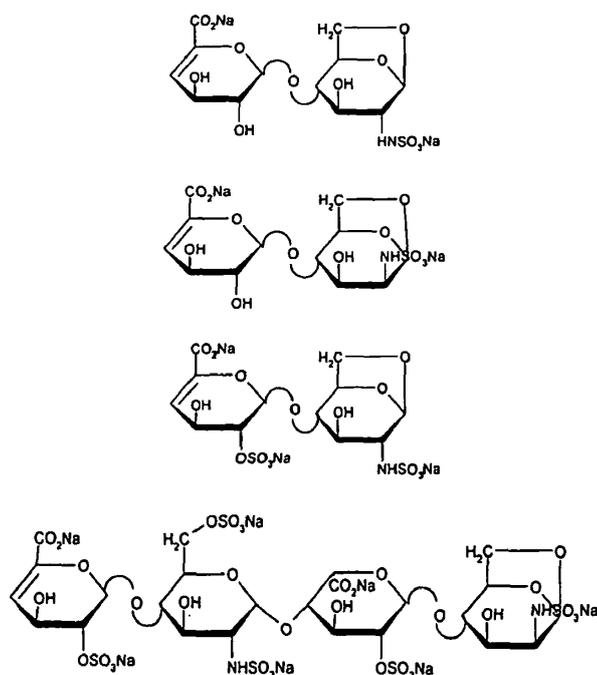
Separación cromatográfica de la Enoxaparina despolimerizada por las heparinasas antes y después de reducción por NaBH₄ (Señal en negro fino : UV a 234nm ; Señal en negro grueso UV : 202 - 234nm)

10 Figura 2: Separación cromatográfica de la heparina despolimerizada por las heparinasas antes y después de reducción por NaBH₄ (Señal en negro fino : UV a 234nm ; Señal en negro grueso : UV: 202 - 234nm)

REIVINDICACIONES

1. Método de análisis de heparinas o de heparinas de bajo peso molecular para buscar la presencia de cadenas de oligosacáridos cuya terminación está modificada por un enlace 1,6-anhidro, caracterizado por que se efectúan las siguientes etapas :

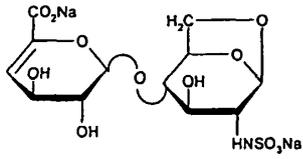
- 5 1) despolimerización de la muestra por acción de las heparinasas,
- 2) reducción del despolimerizado,
- 3) dosificación por cromatografía líquida de alta resolución, el método de cromatografía utilizado que es una cromatografía por intercambio de aniones para la determinación de los grupos 1,6-anhidro, en la que :
- 10 - se utiliza una fase móvil transparente en el UV hasta 200 nm y
- una doble detección a 234 nm por una parte y 202-230nm por otra parte que permite detectar selectivamente los azúcares acetilados, efectuándose dicho método tomando como señal, para la detección selectiva de los azúcares acetilados, la diferencia entre la absorbancia a estas 2 longitudes de onda (202 y 230 nm) elegidas de tal manera que la absorptividad de los sacáridos no acetilados se anula,
- 15 y caracterizada por que los residuos 1,6-anhidro obtenidos durante la reacción de despolimerización son los siguientes :



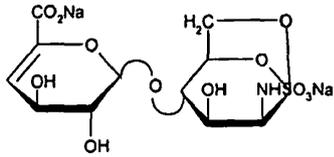
- 20 2. Método tal como se define en la reivindicación 1 caracterizado por que las heparinasas son en forma de una mezcla de heparinasa 1 (EC 4.2.2.7.), de heparinasa 2 (heparina liasa II) y de heparinasa 3 (EC.4.2.2.8.)
3. Método tal como se define en la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la heparina despolimerizada por acción de heparinasa (despolimerizado) se somete a continuación a un agente de reducción.
- 25 4. Método tal como se define en la reivindicación 3, caracterizado por que el agente de reducción es el NaBH_4 o una sal de metal alcalino del anión borohidruro.
5. Método tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la fase móvil utilizada es a base de perclorato de sodio, de sales de metano sulfonato o de sales de fosfato.
6. Método tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que las 2 longitudes de onda para la detección de los azúcares acetilados son de 202 y 230 nm.

30

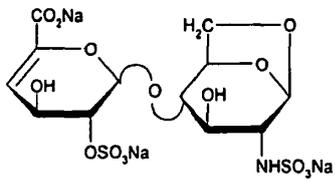
7. Derivado 1,6 anhidro de fórmula (disacárido 1) :



8. Derivado , 1,6 anhidro de fórmula (disacárido 2) :



5 9. Derivado , 1,6 anhidro de fórmula (disacárido 3) :



10. Derivado trisacárido de fórmula :

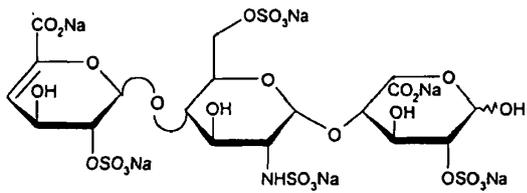


Figura 1

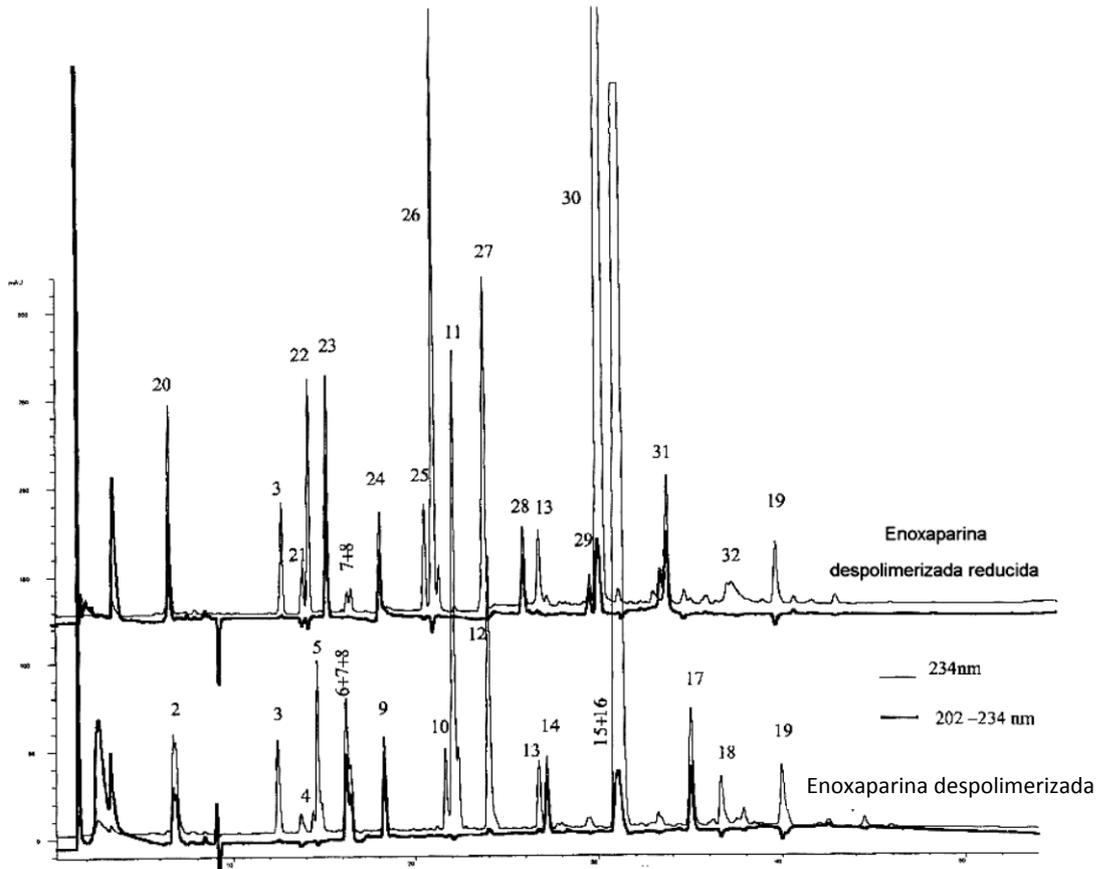


Figura 2

