

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 082**

51 Int. Cl.:

C07H 3/06 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C12Q 1/527 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2005 E 10193919 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2314632**

54 Título: **Proceso para oxidar heparinas no fraccionadas y detectar la presencia o ausencia de glicoserina en heparina y productos de heparina**

30 Prioridad:

24.03.2004 EP 04290791

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

14.05.2013

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 2 403 082 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

Proceso para oxidar heparinas no fraccionadas y detectar la presencia o ausencia de glicoserina en heparina y productos de heparina.

5 En la presente memoria se describe un proceso para oxidar preparaciones de heparina cruda usando al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario. Las preparaciones de heparina resultantes carecen relativamente de residuos de glicoserina y son útiles, por ejemplo, para preparar heparinas de bajo peso molecular (LMWH) y heparinas de ultra-bajo peso molecular (ULMWH) que carecen relativamente de residuos de glicoserina. En la presente memoria también se describe un método para detectar la presencia de glicoserina y derivados de glicoserina en preparaciones de heparina y de heparina fragmentada.

15 Las heparinas son miembros biológicamente activos de la familia glicosaminoglicano y pueden extraerse, por ejemplo, de fuentes bovinas y porcinas. Las heparinas tienen propiedades anticoagulantes y antitrombóticas que las hacen útiles en el tratamiento de trombosis, tales como trombosis arterial y venosa. Como formas aisladas, las moléculas de heparina naturales tienen una alta actividad anticoagulante, que puede dar lugar a hemorragia. Además, las moléculas de heparina son sensibles a factores séricos particulares y, consecuentemente, deben administrarse en dosis altas para proporcionar beneficios antitrombóticos, incrementando en gran medida el riesgo de hemorragia.

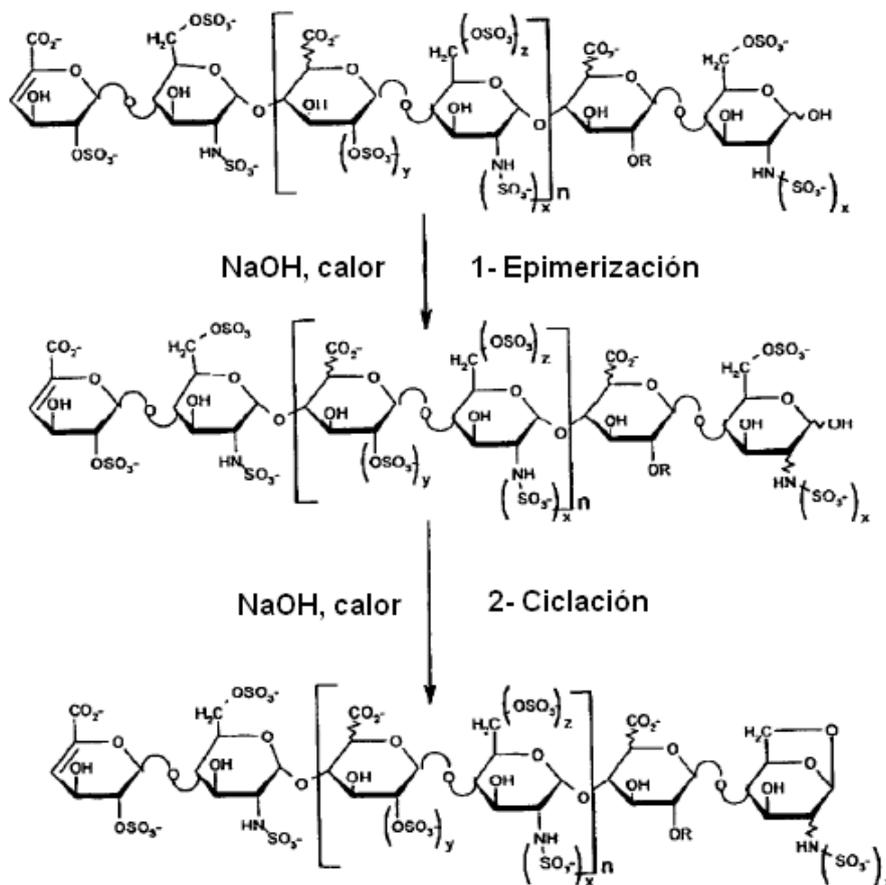
20 Los fragmentos LMWH pueden prepararse por varios procesos a partir de heparina: fraccionamiento mediante disolventes (FR 2.440.376, Pat. U.S. No. 4.692.435); fraccionamiento en una resina aniónica (FR 2.453.875); filtración en gel (Barrowcliffe, Thromb. Res. 12, 27-36 (1977)); cromatografía de afinidad (Pat. U.S. No. 4.401.758); despolimerización controlada mediante un agente químico incluyendo, pero no limitado a, ácido nitroso (EP 14184, EP 37319, EP 76279, EP 623629, FR 2.503.714, Pat. U.S. No. 4.804.652; WO 813276), beta-eliminación de un éster de heparina (EP 40144, Pat. U.S. No. 5.389.618), peryodato (EP 287477), borohidruro de sodio (EP 347588, EP 380943), ácido ascórbico (Pat. U.S. No. 4.533.549), peróxido de hidrógeno (Pat. U.S. No. 4.629.699, Pat. U.S. No. 4.791.195), hidróxido de amonio cuaternario de una sal de amonio cuaternario de heparina (Pat. U.S. No. 4.981.955), hidróxido de metal alcalino (EP 380943, EP 347588), por una ruta enzimática (EP 64452, Pat. U.S. No. 4.396.762, EP 244235, EP 244236; Pat. U.S. No. 4.826.827; Pat. U.S. No. 3.766.167), o mediante irradiación (EP 269981). Véase también Patente U.S. No. 4.303.651 y Patente U.S. No. 4.757.057. Se indica que las mezclas LMWH resultantes demuestran una actividad antitrombótica más alta, debido a una alta actividad anti-factor Xa (aXa) y una menor actividad anti-factor IIa (alla), que la heparina no fraccionada, y frecuentemente son mezclas más deseables para la administración a un paciente que necesita tratamiento para trombosis.

30 Cada fabricante de LMWH de un producto aprobado utiliza un proceso distinto de despolimerización. A no ser que dos fabricantes usen el mismo proceso, esta distinción en el proceso resulta en LMWH con estructuras químicas distintas y, por lo tanto, diferente actividad farmacológica y diferentes indicaciones aprobadas para uso clínico.

35 Por lo tanto, las LMWH se diferencian estructuralmente por los procesos de despolimerización usados para su fabricación (R.J. Linhardt, et al, Seminars in Thrombosis and Hemostatis 1999; 25(3 Sup.): 5-16). Como resultado, las LMWH son más heterogéneas que la heparina. Cada proceso diferente causa modificaciones estructurales únicas y altamente complejas en las cadenas de polisacárido. Estas modificaciones incluyen diferencias en las longitudes de las cadenas y secuencias de las cadenas, así como huellas estructurales. Consecuentemente, cada una de las diferentes LMWH comerciales tienen perfiles farmacológicos distintos y diferentes indicaciones clínicas aprobadas.

40 Durante el proceso para preparar enoxaparina sódica, vendida con la marca registrada Lovenox[®] en los EEUU y Clexane[®] en otros países, a partir de heparina pura, el proceso de despolimerización alcalina en fase acuosa produce una conversión parcial pero característica de las glucosaminas de los extremos reductores de las cadenas de oligosacárido.

45 La primera etapa de esta conversión consiste en una epimerización glucosamina ↔ manosamina (T. Toida, et al., J. Carbohydrate Chemistry, 15(3), 351-360 (1996)); la segunda etapa es una 6-O-desulfuración de la glucosamina, dando lugar a la formación de derivados llamados "1,6 anhidro" (Solicitud de patente internacional WO 01/29055).



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

El porcentaje de cadenas de oligosacárido cuyo extremo está modificado con un enlace 1,6-anhidro es una característica estructural de la mezcla de oligosacáridos de la enoxaparina sódica Lovenox[®]. Tomando como base el conocimiento actual, entre 15% y 25% de los componentes de Lovenox[®] (enoxaparina sódica) tienen una estructura 1,6-anhidro en el extremo reductor de su cadena.

Recientemente, nuevos procesos para la preparación de fragmentos de heparina que emplean despolimerización en presencia de una base fuerte han rendido heparinas de ultra-bajo peso molecular que tienen un peso molecular promedio en peso que varía de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 3.000 Daltons (ULMWH) como se describe, por ejemplo, en Solicitud Publicada de Patente U.S. No. 2002- 0055621 A1, incorporada específicamente por referencia en la presente memoria.

Las composiciones de fragmentos LMWH y ULMWH son heterogéneas y contienen fragmentos de heparina individuales de varias longitudes y pesos moleculares.

Tanto la heparina en sí misma como las mezclas de fragmentos de heparina tienen vidas a temperatura ambiente limitadas debido, al menos en parte, a que se vuelven coloridas durante el almacenamiento. Una vez que desarrollan un color, estas composiciones pueden no ser deseables comercialmente para inyección en pacientes. Un proceso que rinda heparina que resista la coloración es por lo tanto altamente deseable por razones comerciales. Dicha heparina resistente a la coloración puede, por supuesto, usarse para preparar LMWH y/o ULMWH resistentes a la coloración por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Además, un método para evaluar el potencial de las preparaciones de heparina para colorearse sería útil en la fabricación de heparina, LMWH, y ULMWH.

US 3.135.660 describe un proceso para purificar carbohidratos sulfatados con agentes oxidantes. US 3.174.904 describe un proceso para decolorar carbohidratos sulfatados y GB 766 992 se refiere a un proceso de preparación de heparina decolorada.

En la presente memoria se describe un proceso para preparar heparina que es resistente a la coloración. La heparina resultante puede emplearse posteriormente para producir mezclas LMWH y ULMWH, particularmente mezclas disponibles comercialmente, tales como fraxiparina, fragmina, innohep (o logiparina), normiflo, embollex (o sandoparina), fluxum (o minidaltón), clivarina, e hibor, que son resistentes a la coloración. Puede utilizarse la enoxaparina, vendida comercialmente como Lovenox[®] (enoxaparina sódica) en los EEUU y Clexane[®] (enoxaparina

sódica) en algunos otros países. La enoxaparina está disponible comercialmente en Aventis Pharma S.A. y Aventis Pharmaceuticals, Inc. También se describe un método para monitorizar la tendencia de la heparina y mezclas de fragmentos de heparina a colorearse.

5 Se describe un proceso para preparar heparina, que usa al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, tal como permanganato de potasio, en un proceso de oxidación de heparina para producir composiciones heparínicas que carecen de glicoserina. Este proceso se describe más adelante. En la presente memoria se describe que si se utiliza al menos una de estas sales de permanganatos, tal como permanganato de potasio, en la etapa de oxidación, puede obtenerse heparina que carece de glicoserina o baja en glicoserina. También se describió que la eliminación de los
10 residuos de glicoserina y/o los derivados de glicoserina de la heparina puede dar lugar a productos con características comerciales mejoradas. Estos productos con glicoserina reducida son incoloros o casi incoloros y muestran una tendencia disminuida a colorearse respecto a los productos preparados con heparina que no se ha oxidado en presencia de permanganato de potasio.

15 Además, también se describe un método para detectar residuos de glicoserina (o la ausencia de éstos) en composiciones de heparina. Este método incluye pre-tratamiento de la heparina con una o más heparinasas y detección de los grupos acetilados usando cromatografía. Más adelante se proporcionan descripciones más detalladas.

Se proporcionan condiciones que permiten la eliminación quimioselectiva de residuos de glicoserina y derivados de glicoserina, tales como glicoserinas oxidadas, de la heparina.

20 Se describe que al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, tal como permanganato de potasio se usa en un proceso de oxidación de heparina que comprende la oxidación con aproximadamente 4% a aproximadamente 10% en peso respecto a la heparina de dicha al menos una sal de permanganato de manera que se obtiene una heparina baja en glicoserina o que carece de glicoserina. Si la heparina baja en glicoserina o que carece de glicoserina resultante se despolimeriza
25 usando métodos conocidos en la técnica, pueden obtenerse LMWH o ULMWH baja en glicoserina o que carece de glicoserina tales como, fraxiparina, fragmina, innohep (o logiparina), normiflo, embollex (o sandoparina), fluxum (o minidaltón), clivarina, e hibor, pero no enoxaparina sódica. Se cree que los procesos comerciales, sin embargo, para fabricar estos productos comerciales contienen detalles patentados que, al menos en el caso de la enoxaparina, pueden afectar las propiedades biológicas del producto final, como se explica en 19 febrero, 2003, Citizen Petition and Citizen Petition Supplement (03P-0064/CP1) presentado en nombre de Aventis Pharmaceuticals Inc., una filial de Aventis SA, el cesionario y disponible públicamente en la United States Food and Drug Administration (USFDA).
30

La descripción también se refiere a un proceso para preparar al menos un producto de heparina decolorado elegido de fraxiparina, fragmina, innohep (logiparina), normiflo, embollex (sandoparina), fluxum (minidaltón), clivarina, e hibor a partir de heparina que comprende:

35 a) purificación de la heparina por oxidación con aproximadamente 4% a aproximadamente 10% en peso respecto a la heparina de al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, en el que la oxidación ocurre a una temperatura que varía de aproximadamente 35°C a aproximadamente 90°C; y

40 b) despolimerización por un fabricante de la heparina oxidada según un proceso para obtener dicho producto de heparina.

45 Alternativamente, el fabricante puede despolimerizar la heparina oxidada con aproximadamente 4% a aproximadamente 10% en peso respecto a la heparina de al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, en el que la oxidación ocurre a una temperatura que varía de aproximadamente 35°C a aproximadamente 90°C según un proceso para obtener dicho producto de heparina

50 En general, y no necesariamente respecto a los procesos comerciales, los métodos adecuados para la despolimerización se describen, por ejemplo, en FR 2.440.376, Pat. U.S. No. 4.692.435, FR 2.453.875, Barrowcliffe, Thromb. Res. 12, 27-36 (1977), Pat. U.S. No. 4.401.758, EP 14184, EP 37319, EP 76279, EP 623629, FR 2.503.714, Pat. U.S. No. 4.804.652, WO 813276, EP 40144, Pat. U.S. No. 5.389.618, EP 287477, EP 347588, EP 380943, Pat. U.S. No. 4.533.549, Pat. U.S. No. 4.629.699, Pat. U.S. No. 4.791.195, Pat. U.S. No. 4.981.955, EP 380943, EP 347588, EP 64452, Pat. U.S. No. 4.396.762, EP 244235, EP 244236, Pat. U.S. No. 4.826.827, Pat. U.S. No. 3.766.167, EP 269981, Patente U.S. No. 4.303.651, Patente U.S. No. 4.757.057, y Solicitud Publicada de Patente U.S. No. 2002- 0055621 A1, todas las cuales se incorporan en la presente memoria por su descripción de dichos métodos, excepto que Pat. U.S. No. 5.389.618 se incorpora sólo como se ha corregido actualmente en el
55 procedimiento de reedición concurrente.

El uso de al menos una de la sal de permanganato, tal como permanganato de potasio, también se describe en el proceso de oxidación de la heparina descrito anteriormente, es decir, la oxidación con aproximadamente 4% a

- 5 aproximadamente 10% en peso respecto a dicha de la heparina de dicha al menos una de las sales de permanganato para obtener una heparina que está decolorada. Si la heparina decolorada resultante se despolimeriza, podrían obtenerse productos de heparina decolorados incluyendo LMWH o ULMWH tales como fraxiparina, fragmina, innohep (o logiparina), normiflo, embollex (o sandoparina), fluxum (o minidaltón), clivarina, e hibor, sujeto al comentario sobre los procesos comerciales hecho anteriormente.
- 10 En la presente memoria también se describe el uso de permanganato de potasio en el proceso de oxidación de la heparina, descrito anteriormente, para obtener una heparina baja en glicoserina o que carece de glicoserina y decolorada. Si la heparina baja en glicoserina o que carece de glicoserina y decolorada resultante se despolimeriza, podrían obtenerse productos de heparina decolorados incluyendo LMWH o ULMWH tales como fraxiparina, fragmina, innohep (o logiparina), normiflo, embollex (o sandoparina), fluxum (o minidaltón), clivarina, e hibor, como se ha explicado anteriormente.
- 15 En la descripción, la expresión "heparina" significa todas las formas de heparina distintas de un producto de heparina, incluyendo sin limitación heparina cruda, heparina mejorada y heparina purificada.
- En la descripción, la expresión "heparina mejorada" significa heparina que tiene una actividad anti Xa incrementada comparada con la heparina de partida antes de la mejora. Por ejemplo, y sin limitación, si la actividad anti Xa de la heparina de partida es 140 IU/mg, la heparina mejorada puede tener una actividad anti Xa de 1501U/mg ó 200 IU/mg.
- 20 En la descripción, la expresión "heparina de bajo peso molecular" o "LMWH" significa una mezcla de polisacáridos obtenida de la heparina y que tiene un peso molecular promedio en peso mayor de aproximadamente 3.000 Daltons y menor de aproximadamente 10.000 Daltons.
- En la descripción, la expresión "heparina de ultra-bajo peso molecular" o "ULMWH" significa una mezcla de polisacáridos obtenida de la heparina que tiene un peso molecular promedio en peso que varía de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 3.000 Daltons.
- 25 En la descripción, la expresión "despolimerización" (y variaciones de ésta tal como despolimerizar o despolimerizando) incluye todos los tipos de despolimerización, incluyendo sin limitación fragmentación, despolimerización química y enzimática, y otros métodos para preparar fragmentos de heparina, incluyendo sin limitación fraccionamiento.
- 30 En la descripción, la expresión "baja en glicoserina" significa un porcentaje de glicoserina (tal como, por ejemplo, como se ilustra más adelante en el párrafo 59) menor de o igual a 0,3% de todos los residuos de disacárido en la muestra tienen una glicoserina unida.
- En la descripción, la expresión "que carece de glicoserina" significa un porcentaje de glicoserina (tal como, por ejemplo, como se ilustra más adelante en el párrafo 59) menor de o igual a 0,1% de todos los residuos de disacárido en la muestra tienen una glicoserina unida.
- 35 En la descripción, la expresión "que carece relativamente de glicoserina" significa un porcentaje de glicoserina (tal como, por ejemplo, como se ilustra más adelante en el párrafo 59) menor de o igual a 0,3% de todos los residuos de disacárido en la muestra tienen una glicoserina unida.
- 40 En la descripción, la expresión "decolorado" significa menos de o igual a 0,2 unidades de absorbancia en un ensayo de estabilidad acelerada tal como el que se describe más adelante en el encabezamiento "Preparación para análisis colorimétrico de la muestra." La Figura 1 refleja los resultados de un ensayo de estabilidad acelerada para enoxaparina sódica.
- En la descripción, la expresión "coloración" significa más de 0,2 unidades de absorbancia en un ensayo de estabilidad acelerada tal como el que se describe más adelante en el encabezamiento "Preparación para análisis colorimétrico de la muestra." La Figura 1 refleja los resultados de un ensayo de estabilidad acelerada para enoxaparina sódica.
- 45 En la descripción, la expresión "resistente a la coloración" significa menos de o igual a 0,2 unidades de absorbancia en un ensayo de estabilidad acelerada tal como el que se describe más adelante en el encabezamiento "Preparación para análisis colorimétrico de la muestra." La Figura 1 refleja los resultados de un ensayo de estabilidad acelerada para enoxaparina sódica.
- En la descripción, la expresión "producto de heparina" significa LMWH y ULMWH.
- 50 En la presente memoria se describe que se usa 4% a 10% en peso respecto a la heparina de al menos un permanganato elegido de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, tal como permanganato de potasio, para preparar heparinas purificadas por oxidación. Aproximadamente puede usarse 8 % en peso respecto a la heparina de permanganato de potasio en un proceso para preparar heparinas purificadas por oxidación.

En la presente memoria se describe que el proceso para preparar heparinas purificadas por oxidación con al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, tal como permanganato de potasio, se realiza a una temperatura que varía de aproximadamente 35°C a aproximadamente 90°C. El proceso para preparar heparinas purificadas por oxidación con permanganato de potasio puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 40°C a aproximadamente 80°C.

También se describe al menos una composición elegida de LMWH y ULMWH baja en glicoserina, que carece de glicoserina y decoloradas, exclusiva de productos aprobados por la USFDA a partir de la fecha de presentación de esta solicitud, dicha composición que puede obtenerse según un proceso que comprende las etapas siguientes:

a) purificación de la heparina por la acción de 4% a 10% en peso respecto a la heparina de al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, tal como permanganato de potasio, en el que la oxidación ocurre a una temperatura que varía de aproximadamente 35°C a aproximadamente 90°C;

b) despolimerización de la heparina; y

c) opcionalmente, purificación de la al menos una composición.

Se describe que al menos una composición elegida de LMWH y ULMWH bajas en glicoserina, que carecen de glicoserina y decoloradas, exclusiva de productos aprobados por la USFDA a partir de la fecha de presentación de esta solicitud, que puede obtenerse según un proceso que comprende despolimerizar la heparina oxidada por la acción de 4 a 10% en peso respecto a la heparina de al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, en el que la oxidación ocurre a una temperatura que varía de aproximadamente 35°C a aproximadamente 90°C.

Además, también se describe un método para determinar el contenido de glicoserina de una muestra de una heparina o un producto de heparina, incluyendo, pero no limitado a, LMWH y ULMWH y formas disponibles comercialmente de éstas, comprendiendo dicho método:

a) tratar una muestra elegida de heparinas y productos de heparina; y

b) a partir de ahí, usar un proceso de cromatografía para determinar la presencia de residuos de glicoserina en la muestra.

La muestra elegida de las heparinas y productos de heparina puede tratarse por despolimerización mediante la acción de una heparinasa antes de analizarla en el proceso de cromatografía. La muestra elegida de las heparinas y productos de heparina puede despolimerizarse por la acción de una mezcla de heparinasas. Por ejemplo, la mezcla de heparinasas puede comprender heparinasa 1 (EC 4.2.2.7.), heparinasa 2 (heparin liasa II), y heparinasa 3 (EC 4.2.2.8.). Puede usarse cromatografía de intercambio aniónico (SAX - Strong Anionic Exchange) para determinar la presencia (o ausencia) de glicoserina en la muestra después de tratar la muestra. La fase estacionaria para la cromatografía de intercambio aniónico puede injertarse con derivados de amonio cuaternario, incluyendo, por ejemplo, -NMe₃⁺. Tal y como se usa en la presente memoria, el término " cromatografía de intercambio aniónico fuerte" (SAX) engloba cromatografía de intercambio aniónico realizada en cualquier resina que mantiene una carga positiva neta constante en el intervalo de aproximadamente pH 2-12. La cromatografía de intercambio aniónico fuerte puede usar un soporte sólido funcionalizado con grupos de intercambio de amonio cuaternario. Por ejemplo, pueden usarse columnas tales como Spherisorb® SAX (Waters Corp, Milford MA) que tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 5 µm, una longitud de columna de aproximadamente 25 cm y un diámetro de columna de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 4,6 mm puede usarse. Puede usarse cromatografía CTA-SAX, como se describe en la Solicitud de Patente U.S. titulada "Method for Determining Specific Groups Constituting Heparins or Low Molecular Weight Heparins" presentada con el USPTO en la misma fecha que la presente e incorporada por la presente en la presente memoria por referencia solamente para referencias a cromatografía CTA-SAX. La cromatografía CTA-SAX se define en dicha solicitud como cromatografía de intercambio aniónico realizada en una sal de amonio cuaternario recubierta dinámicamente en una columna de sílice de fase reversa que mantiene una carga positiva neta constante en el intervalo de aproximadamente pH 2 a aproximadamente pH 12.

En la presente memoria se describe un método para cuantificar el contenido de glicoserina de una muestra de una heparina o producto de heparina analizando la muestra para contenido de glicoserina. El análisis de la muestra puede incluir digerir enzimáticamente la muestra y cuantificar el contenido de los residuos de glicoserina en la muestra digerida por métodos de cromatografía tal como HPLC. Puede utilizarse CTA-SAX o SAX para cuantificar el contenido de residuos de glicoserina. Por ejemplo, y sin limitación, el contenido de glicoserina de la muestra puede reducirse por debajo del 2,0 % de la muestra, por debajo del 0,3 % de la muestra o por debajo del 0,1 % de la muestra. El contenido de glicoserina de la muestra también puede ser 0,0 % (es decir, indetectable).

Se describe que en el método para determinar el contenido de glicoserina de una muestra de una heparina o un producto de heparina, la fase móvil para la etapa de cromatografía es luz transparente a ultravioleta (UV) en un intervalo de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 400 nm. La fase móvil puede comprender, por ejemplo,

perclorato de sodio, sales de metanosulfonato, o sales de fosfato. El método para determinar el contenido de glicoserina después del tratamiento de una muestra elegida de heparinas y productos de heparina, los polisacáridos pueden detectarse por su absorción UV después de cromatografía. La absorción UV de los polisacáridos puede medirse a dos longitudes de onda por ejemplo, 202 nm y 240 nm, después de cromatografía de manera que las señales de absorción de los polisacáridos no acetilados se anulan.

También se describe un método para monitorizar el contenido de glicoserina de una muestra de una heparina o un producto de heparina, comprendiendo dicho método:

- a) eliminar y/o disminuir los residuos de glicoserina y/o glicoserina oxidada de la muestra; y
- b) analizar la muestra usando un proceso de cromatografía para detectar la presencia o ausencia de residuos de glicoserina y/o glicoserina oxidada en la muestra.

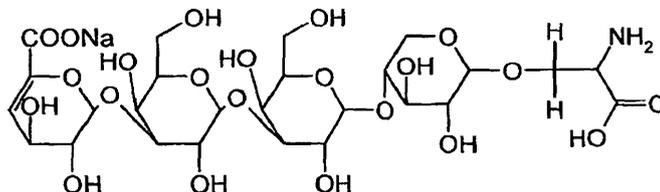
La eliminación y/o disminución de residuos de glicoserina y/o glicoserina oxidada puede comprender

- a) purificación de la heparina por oxidación con aproximadamente 4% a aproximadamente 10% en peso respecto a la heparina de al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, en el que la oxidación ocurre a una temperatura que varía de aproximadamente 35°C a aproximadamente 90°C; y
- b) despolimerización de la heparina oxidada.

El contenido de glicoserina de una muestra elegida de heparinas y productos de heparina puede cuantificarse, por ejemplo, bien por calibración externa o calibración interna. La calibración interna puede comprender el uso de un estándar interno tal como ácido 2-naftol-3, 6-disulfónico. En otra realización relacionada, la disolución que se va a ensayar puede contener aproximadamente 0,15 g/l de ácido 2-naftol-3, 6-disulfónico.

También se describe un método para predecir la tendencia de una heparina o un producto de heparina para colorearse, que comprende medir el contenido de glicoserina de dicha heparina o producto de heparina. El contenido de glicoserina puede cuantificarse por calibración externa o interna. La calibración interna puede comprender el uso de un estándar interno. El estándar interno puede ser ácido 2-naftol-3, 6-disulfónico o aproximadamente 0,15 g/l de ácido 2-naftol-3, 6 disulfónico.

La etapa de cromatografía puede detectar el tetrasacárido del dominio de unión a glicoserina de las moléculas de heparina. El tetrasacárido del dominio de unión a glicoserina de la heparina es:



Un experto en la técnica apreciará que este método y los aspectos descritos en la presente memoria pueden usarse para determinar el contenido de glicoserina de LMWH y ULMWH conocidas en la técnica, así como aquellas disponibles comercialmente.

Se describen los dibujos adjuntos, que se incorporan en esta especificación.

La Figura 1 ilustra ensayos de estabilidad acelerada de enoxaparina sódica no tratada con permanganato y tratada con permanganato, disponible comercialmente como se ha descrito anteriormente.

La Figura 2 es un cromatograma representativo de un material de heparina despolimerizado.

La Figura 3 es un espectro de UV que ilustra un método para la detección selectiva de azúcares acetilados.

La RMN del tetrasacárido GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser (pico n°1) muestra un espectro en D₂O, 500MHz(δ en ppm) como sigue: 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, pico no resuelto), 3,91 (2H, pico no resuelto), 3,96 (1H, dd, 7 y 2Hz), entre 4,02 y 4,10 (3H, pico no resuelto), 4,12 (1H, d, 2Hz), 4,18 (1H, pico no resuelto), 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).

La presencia de residuos de glicoserina en las preparaciones de heparina, LMWH, y ULMWH puede causar problemas de calidad y estabilidad que disminuyen el valor comercial del producto. Por ejemplo, en los ensayos de estabilidad de enoxaparina, los residuos de glicoserina incrementan la velocidad de coloración y pueden dar lugar a lotes de producto que no están dentro de las especificaciones de fabricación aprobadas. Véase la Figura 1. El control de la cantidad de glicoserina en la heparina hace posible estandarizar mejor los productos comerciales

resultantes, incluyendo LMWH, y ULMWH. Como consecuencia, el riesgo de producir lotes de producto que no pueden venderse puede disminuir.

5 Se ha descrito que la acción de al menos una de las sales de permanganato mencionadas en la presente memoria, tal como permanganato de potasio, hace posible escindir selectivamente el residuo de glicoserina en la cadena de heparina. Además, se han caracterizado los sitios de acción del permanganato, el mecanismo de acción del permanganato, y las estructuras resultantes de la acción del permanganato.

Consecuentemente, se describen una heparina decolorada que carece de glicoserina y un proceso para preparar heparina decolorada que carece de glicoserina, comprendiendo dicho proceso las etapas siguientes:

10 a) tratamiento de la heparina con de aproximadamente 4% a aproximadamente 10% respecto al peso de la heparina de al menos un permanganato elegido de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, tal como permanganato de potasio, a una temperatura que varía de aproximadamente 35°C a aproximadamente 90°C según el proceso como se ha descrito anteriormente; y

b) purificación de la heparina decolorada que carece de glicoserina.

15 La temperatura puede variar de aproximadamente 40°C a aproximadamente 80°C. En este intervalo, el 8 % respecto al peso de la heparina del tratamiento con permanganato puede mantener su eficacia en la eliminación de residuos de glicoserina. Y a concentraciones de permanganato iguales a o mayores del 4 % respecto al peso de la heparina de permanganato a una temperatura de aproximadamente 80°C, el tratamiento descrito puede eliminar virtualmente los residuos de glicoserina detectables. Por debajo del 4 % respecto al peso de la heparina del permanganato, el tratamiento puede no ser ya suficiente para eliminar los residuos de glicoserina (como se observa en el ejemplo 9
20 más adelante). De hecho, la concentración de permanganato de potasio usada en la etapa de oxidación es más importante que la temperatura en la reducción o eliminación de los residuos de glicoserina.

la heparina preparada como se ha descrito anteriormente puede a su vez usarse para preparar otros productos de heparina que carecen de glicoserina y decolorados, por ejemplo, fraxiparina, enoxaparina, fragmina, innohep (o logiparina), normiflo, embollex (o sandoparina), fluxum (o minidaltón), clivarina e hibor.

25 También se describe un proceso para preparar enoxaparina decolorada a partir de heparina, comprendiendo dicho proceso:

30 a) purificación de la heparina por oxidación con aproximadamente 4% a aproximadamente 10% en peso respecto a la heparina de al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, en el que la oxidación ocurre a una temperatura que varía de aproximadamente 35°C a aproximadamente 90°C; y

b) despolimerización por un fabricante distinto de uno elegido de Aventis Pharma SA, sus filiales en propiedad absoluta, y sus sucesores y cesionarios, y agentes de Aventis Pharma SA, sus filiales en propiedad absoluta, y sus sucesores y cesionarios, de la heparina oxidada según un proceso para obtener dicha enoxaparina.

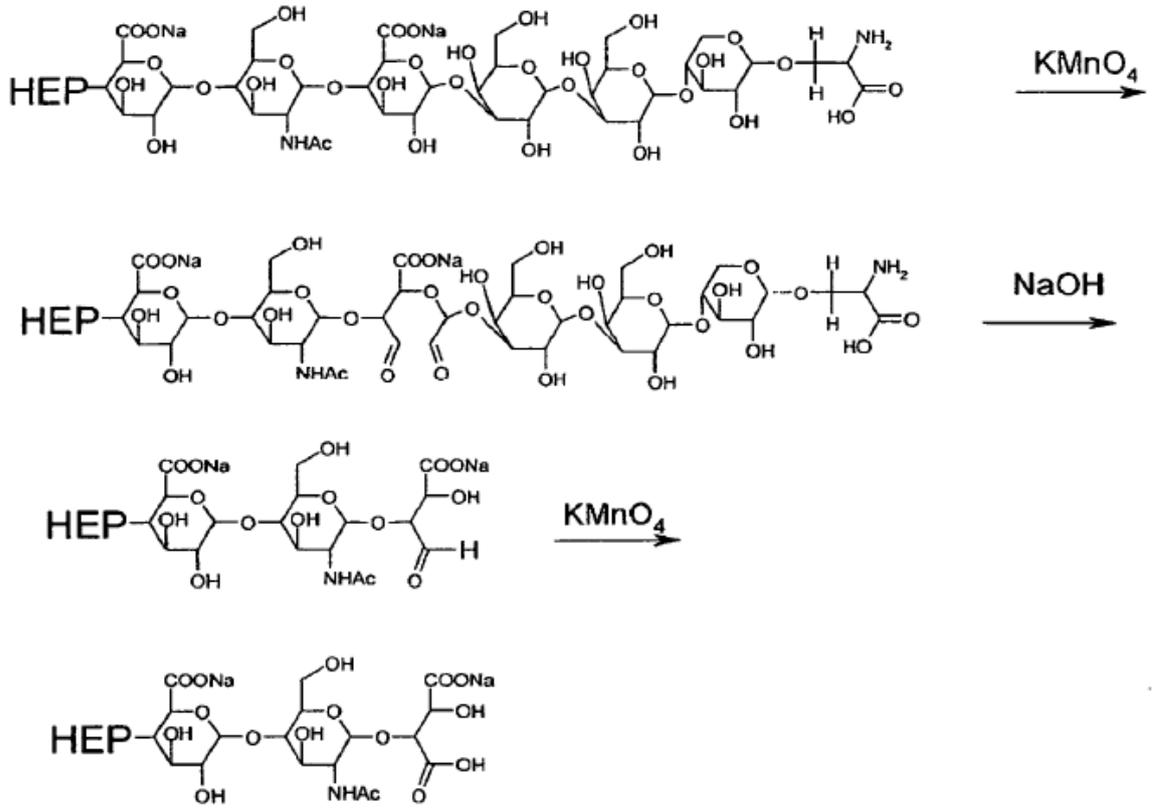
35 Además, se describe un proceso para preparar enoxaparina decolorada, comprendiendo dicho proceso:

40 despolimerización según un proceso por un fabricante distinto de uno elegido de una empresa Aventis, sus sucesores, y cesionarios, y agentes de una empresa Aventis, sus sucesores, y cesionarios, de heparina oxidada por aproximadamente 4 % a aproximadamente 10 % en peso respecto a la heparina de al menos una sal de permanganato elegida de permanganato de potasio, permanganato de sodio, y permanganato de amonio cuaternario, en el que la oxidación ocurre a una temperatura que varía de aproximadamente 35°C a aproximadamente 90°C, para obtener dicha enoxaparina.

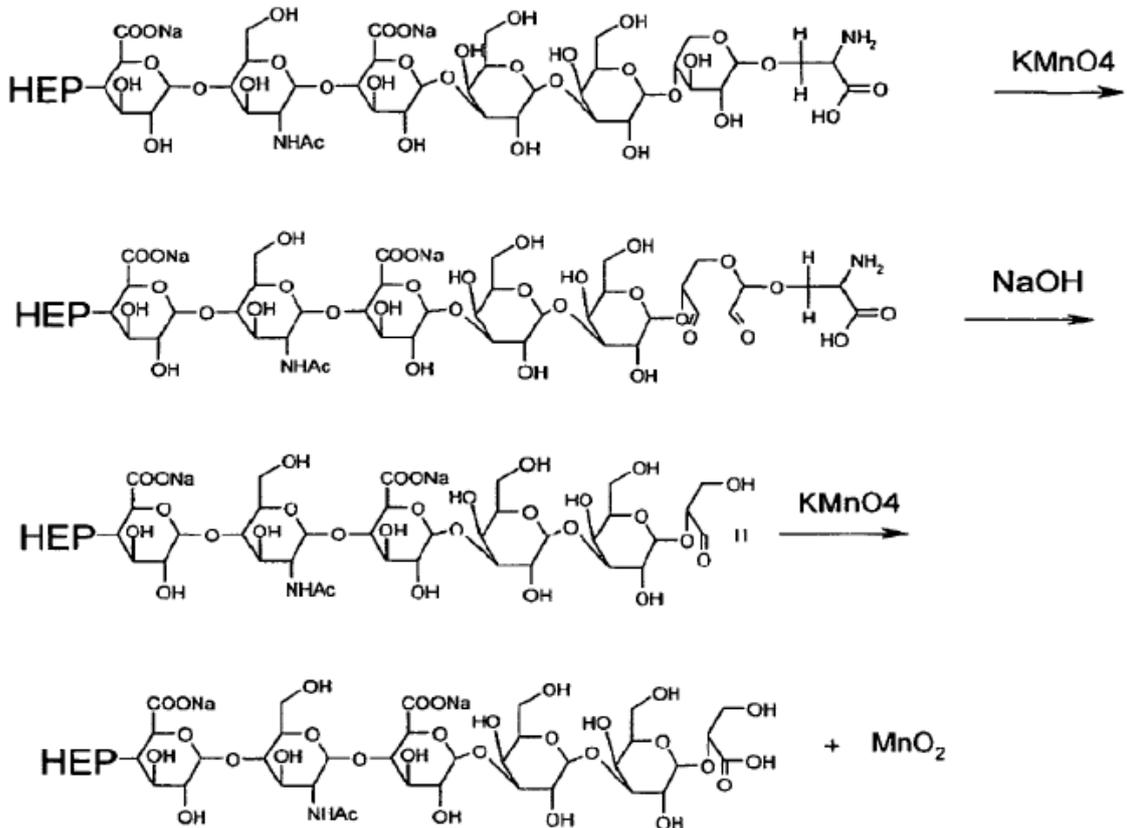
45 Además, la heparina preparada como se ha descrito anteriormente puede a su vez usarse para preparar ULMWH decoloradas que carecen de glicoserina. Los métodos para preparar LMWH y ULMWH se describen, por ejemplo, en FR 2.440.376, Pat. U.S. No. 4.692.435, FR 2.453.875, Barrowcliffe, Thromb. Res. 12, 27-36 (1977), Pat. U.S. No. 4.401.758, EP 14184, EP 37319, EP 76279, EP 623629, FR 2.503.714, Pat. U.S. No. 4.804.652, WO 813276, EP 40144, Pat. U.S. No. 5.389.618, EP 287477, EP 347588, EP 380943, Pat. U.S. No. 4.533.549, Pat. U.S. No. 4.629.699, Pat. U.S. No. 4.791.195, Pat. U.S. No. 4.981.955, EP 380943, EP 347588, EP 64452, Pat. U.S. No. 4.396.762, EP 244235, EP 244236, Pat. U.S. No. 4.826.827, Pat. U.S. No. 3.766.167), EP 269981, Patente U.S. No. 4.303.651, Patente U.S. No. 4.757.057, y Solicitud Publicada de Patente U.S. No. 2002- 0055621 A1, todas las
50 cuales se incorporan en la presente memoria por su descripción de dichos métodos, excepto que Pat. U.S. No. 5.389.618 se incorpora sólo como se ha corregido actualmente en el procedimiento de reedición concurrente.

Por lo tanto, se describe una LMWH decolorada que carece de glicoserina y un proceso para preparar LMWH decolorada que carece de glicoserina, exclusivo de LMWH disponibles reguladas por la USFDA a partir de la fecha de presentación de esta solicitud, comprendiendo dicho proceso las etapas siguientes:

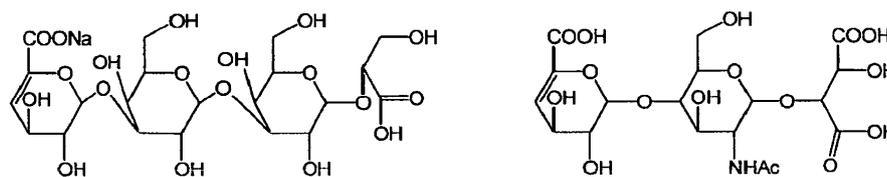
Reacción 2:



Reacción 3:

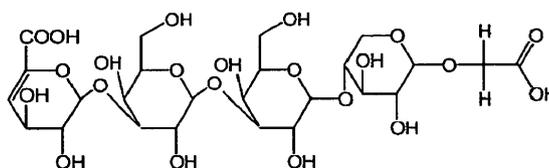


Para identificar los sitios de escisión, el método general es que la heparina tratada con, por ejemplo, permanganato de potasio como se ha descrito anteriormente se somete a la acción de heparinasa III. Esta enzima es altamente específica para las regiones no sulfatadas de la heparina. Despolimeriza selectivamente las unidades de disacárido que contienen ácido urónico sin 2-O-sulfato y el dominio para la unión de heparina a la proteína (la proteína que porta las cadenas de heparina es una cadena serina-glicina). La formación de los disacáridos Δ IVa, Δ IVs del componente Δ IVa-Gal-Gal-Xyl-Ser o de cualquier derivado oxidado de esta - región de unión que porta el disacárido IVa se observa principalmente después de digestión con heparinasa III. Esta enzima no afecta el resto de la cadena de heparina. Consecuentemente, el material despolimerizado contiene una mezcla de oligosacáridos de heparina (disacáridos a tetrasacáridos) y otros polisacáridos. Esta mezcla requiere un pre-tratamiento para eliminar las cadenas de heparina antes de que pueda analizarse por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC). Un experto en la técnica estará familiarizado con varios métodos para eliminar cadenas de heparina, incluyendo, por ejemplo, ultracentrifugación a través de una membrana Millipore (5 kDa) o precipitación con metanol seguida de centrifugación. La disolución así preparada puede analizarse por HPLC. Los fragmentos siguientes pueden identificarse por HPLC acoplamiento (grafito poroso)/espectrometría de masas ("MM" significa masa molecular):



MM = 588

MM = 511

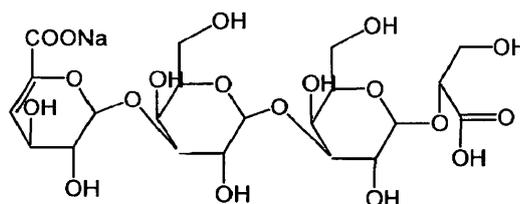
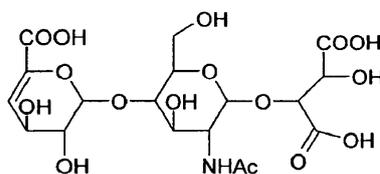


MM = 690

Las estructuras del tetrasacárido MM=690 y del trisacárido MM=588 se confirmaron por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Estos fragmentos demuestran que el tratamiento con permanganato de potasio según la invención actúa selectivamente en la región de la unión de la proteína y elimina el residuo de serina. El compuesto MM=690 es el resultado de la reacción 1 seguido de digestión enzimática. El compuesto MM=511 es el resultado de la reacción 2 seguido de digestión enzimática. El compuesto MM=588 es el resultado de la reacción 3 seguido de digestión enzimática.

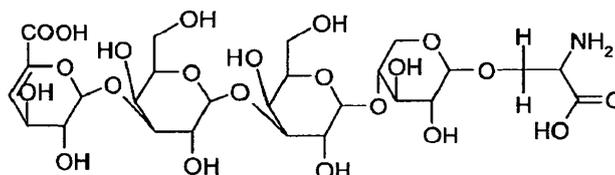
La presente invención se refiere a un compuesto sustancialmente puro que tiene la fórmula:



Los compuestos anteriores MM=511, MM=588 y MM=690 pueden aislarse y obtenerse en forma sustancialmente pura. Tal y como se usa en la presente memoria, "sustancialmente puro" significa suficientemente puro para identificar los compuestos por espectroscopía de masas o RMN. En una realización, un compuesto sustancialmente puro es uno que es al menos 80% puro. En otra realización, un compuesto sustancialmente puro es uno que es al menos 90% puro.

Se describe un método para determinar el contenido de oligosacárido de una muestra de una heparina o producto de heparina que comprende despolimerizar la muestra y analizar la muestra usando un proceso de cromatografía para detectar oligosacáridos elegidos de MM=511, MM=588 y MM=690. El contenido de oligosacárido puede cuantificarse por calibración externa o interna. Se describe que la calibración interna comprende un estándar interno, dicho estándar interno puede ser un compuesto sustancialmente puro seleccionado de MM=511, MM=588 y MM=690.

Para la identificación estructural, utilizando HPLC, la característica de tetrasacárido del dominio conector de unión (glicoserina) puede aislarse e identificarse por RMN (por ejemplo, una heparina cruda puede despolimerizarse selectivamente por la acción de heparinasa III):



Yamada et al. ha caracterizado este fragmento estudiando la despolimerización de la heparina por heparinasas en Yamada et al., J. Bioi. Chem. 270 (39): 22914 (1995); J. Biol. Chem. 267(3): 1528 (1992); Biochemistry, 38: 838 (1999). Hiromi Tsuda et al. (European Journal of Biochemistry, vol. 62, 1999, p. 127-133) se refiere al estudio de modificaciones estructurales del conector -HexA-HexNAc-GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser, que une el glicosaminoglicano y la proteína, usando oligosacáridos conocidos que comprenden un residuo de serina. US 4.496.550 se refiere a oligosacáridos que comprenden 4 a 8 unidades de monosacárido, que poseen actividad anticoagulante.

Como los problemas de coloración afectan potencialmente la vida a temperatura ambiente de la heparina LMWH, y las preparaciones ULMWH, y por lo tanto requieren un control de calidad durante el proceso de fabricación, también se describe un método para analizar dichas preparaciones con el fin de detectar y/o cuantificar la presencia de glicoserina y sus derivados oxidados. Dicho método puede comprender las etapas siguientes:

- a) despolimerización de la muestra;
- b) si la muestra es heparina o un producto de heparina, separación de los oligosacáridos resultantes por HPLC; y
- c) detección de oligosacáridos que contiene glicoserina y/ sus derivados oxidados.

La despolimerización de la muestra puede conseguirse mediante la acción de una mezcla de heparinasas que comprende, por ejemplo, heparinasa 1 (EC 4.2.2.7.), heparinasa 2 (heparin liasa 11), y heparinasa 3 (EC 4.2.2.8.), que están disponibles en Grampian Enzymes. La despolimerización enzimática puede realizarse durante un periodo de horas, que puede determinar un experto en la técnica, a una temperatura apropiada, que también puede determinar un experto en la técnica. Por ejemplo, la despolimerización enzimática puede realizarse durante 48 horas a temperatura ambiente mezclando 20 μ l de una disolución acuosa que contiene 20 mg/ml de la heparina que se va a ensayar, y 100 μ l de una disolución 100 mM de ácido acético/NaOH, a pH 7,0, que contiene 2 mM de acetato de calcio y 2 mg/ml de BSA, con 20 μ l de una disolución madre que comprende una mezcla de heparinasa 1, heparinasa 2, y heparinasa 3, que comprende 0,5 unidades/ml de cada heparinasa 1, 2, y 3. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente estas condiciones ejemplares a diferentes cantidades de sustrato y enzima.

También se describe que los diferentes polisacáridos y oligosacáridos presentes en una muestra despolimerizada se separan y cuantifican usando métodos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los polisacáridos y oligosacáridos que comprenden glicoserina y sus derivados oxidados pueden separarse por HPLC usando cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, con una fase estacionaria injertada con derivados de amonio cuaternario tal como -NMe₃⁺. La columna de cromatografía puede llenarse con cualquiera de una variedad de resinas disponibles, por ejemplo, del tipo Spherisorb SAX con un tamaño de partícula en el intervalo por ejemplo de 5 a 10 μ m.

El aparato usado puede ser cualquier cromatógrafo que permita la formación de un gradiente de elución y que pueda utilizar un detector UV. El detector UV puede ser un diodo en serie que pueda medir espectros UV para los constituyentes en al menos dos longitudes de onda diferentes y registrar las señales que resultan de la diferencia entre las absorbancias a estas longitudes de onda diferentes. Esto permite la detección específica de oligosacáridos acetilados. Para permitir este tipo de detección, pueden usarse fases móviles que sean transparentes a la luz UV hasta 200 nm. Las fases móviles ejemplares pueden estar basadas en sales perclorato, metanosulfonato o fosfato. Y el pH de la fase móvil para la separación puede ser de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6,5. El pH de la fase móvil puede ser aproximadamente 3. Como todos los polisacáridos no acetilados tienen, a un pH dado, un espectro UV bastante similar, es posible detectar selectivamente azúcares acetilados tomando, como la señal, la diferencia entre la absorbancia a dos longitudes de onda elegidas de manera que la capacidad de absorción de los sacáridos no acetilados se anula.

La cuantificación de los polisacáridos y oligosacáridos que comprenden glicoserina y sus derivados oxidados puede realizarse usando métodos para calibración externa o interna. Se describe que el estándar interno usado es ácido 2-naftol-3, 6-disulfónico y que la disolución acuosa de heparina que se va a ensayar contiene aproximadamente 0,15 g/l de ácido 2-naftol-3, 6-disulfónico. La muestra despolimerizada puede ensayarse por cromatografía según el método descrito en la patente FR 0211724 presentada el 23 de septiembre, 2002, que se incorpora por referencia en la presente memoria, y se ilustra más adelante para su aplicación específica al método para ensayar el contenido de glicoserina.

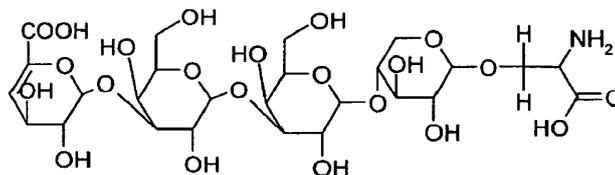
Como ejemplo, a continuación se proporcionan las posibles condiciones para la separación cromatográfica según la descripción:

- 10 – columna 5 µm spherisorb SAX, 25 cm de longitud, diámetro interno 2,1 mm.
- Disolvente A: 2,5 mM NaH₂PO₄ llevado a pH 2,9 por adición de H₃PO₄.
- Disolvente B: 1 N NaClO₄ - 2,5 mM NaH₂PO₄ llevado a pH 3,0 por adición de H₃PO₄.

El gradiente de elución puede ser como sigue:

- T = 0 min: %B = 3;
- 15 – T = 40 min: %B = 60; y
- T = 60 min: % B = 80.

Un cromatograma representativo del resultado de analizar un material de heparina despolimerizado según estas condiciones ejemplares se muestra en la figura 2. El tetrasacárido del método de análisis como se ha descrito anteriormente es:



En la presente memoria también se describe un método de detección utilizado durante la separación cromatográfica. Se ha desarrollado un método con el fin de incrementar la especificidad de la detección UV. Como se muestra en la figura 3, se elegirán 202 nm y 240 nm como longitud de onda de detección y referencia y se indicará la señal 202 - 240 nm. Un detector adecuado para esta técnica es el detector DAD 1100 de la empresa Agilent Technologies. En este caso, se realizará una doble detección, en primer lugar, a 234 nm y, en segundo lugar, a 202-240 nm.

En la presente memoria se describe un método de análisis como se ha definido anteriormente, usando separación por cromatografía de intercambio aniónico, en el que el método de detección hace posible detectar selectivamente los azúcares acetilados.

Además, también se describe un método de análisis como se ha definido anteriormente, usando separación por cromatografía de intercambio, en el que la detección selectiva de los azúcares acetilados se realiza tomando, como señal, la diferencia entre la absorbancia a dos longitudes de onda elegidas de manera que la capacidad de absorción de los sacáridos no acetilados se anula.

Preparación para análisis colorimétricos de la muestra

Puede prepararse una disolución en agua de manera que la concentración se ajusta a 100 mg/ml, y la disolución obtenida se filtra a través de un filtro de membrana con una porosidad de 0,22 µm. Se mide el valor de la absorbancia a 400 nm. Esta medida corresponde al valor inicial para el estudio. La disolución se distribuye en siete botellas en una proporción de aproximadamente 5 ml por botella. Las muestras se ajustan poniéndolas en un horno a 45°C. Cada semana, se saca una botella del horno y se mide el valor de la absorbancia a 400 nm a 20°C. Después de 6 semanas, puede determinarse la idoneidad de la muestra.

40 Nomenclatura de los sacáridos y relación con los picos según el cromatograma en la figura 2:

IdoA: ácido α-L-idopiranosilurónico;

GlcA: ácido β-D-glucopiranosilurónico;

ΔGlcA: ácido 4,5-insaturado: ácido 4-desoxi-α-L-*treo*-hex-4-enopiranosilurónico;

- Gal: D-galactosa;
- Xyl: xilosa;
- GlcNAc: 2-desoxi-2-acetamido- α -D-glucopiranososa;
- GlcNS: 2-desoxi-2-sulfamido- α -D-glucopiranososa;
- 5 2S: 2-O-sulfato;
- 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
- 10 2: (ácido 4-desoxi- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido- α -D-glucopiranososa, sal de sodio;
- 5: (ácido 4-desoxi- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido- α -D-glucopiranososa, sal de disodio;
- 6: (ácido 4-desoxi- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranososa, sal de disodio;
- 15 9: (ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido- α -D-glucopiranososa, sal de disodio;
- 11: (ácido 4-desoxi- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranososa, sal de trisodio;
- 20 12: (ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido- α -D-glucopiranososa, sal de trisodio;
- 14: (ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranososa, sal de trisodio;
- 25 15: (ácido 4-desoxi- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(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-glucopiranososa, sal de pentasodio;
- 16: (ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranososa, sal de tetrasodio;
- 30 17: (ácido 4-desoxi- α -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(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-glucopiranososa, sal de hexasodio.

Así, el método como se ha descrito anteriormente incluye un método para pre-tratar la muestra antes de analizarla y el proceso de cromatografía usado para determinar la presencia o ausencia del tetrasacárido característico del dominio de unión.

Ejemplos

- 35 En los ejemplos siguientes la abreviatura "NI" significa normalización interna. Los Ejemplos 6-11 demuestran la influencia de la temperatura y concentración de permanganato de potasio en la eliminación de residuos de glicoserina de la heparina.

Ejemplo 1: Preparación de Heparina "Mejorada"

- 40 Este proceso incrementa la actividad anti-Xa de una preparación de heparina cruda y puede emplearse antes de usar una preparación de heparina en el proceso para eliminar residuos de glicoserina. La heparina "mejorada" preparada en este ejemplo se usó en los ejemplos 2-10. Y la actividad anti-Xa inicial de la preparación de heparina cruda usada en este ejemplo es 150 IU/mg.

- 45 Quinientos veinte mililitros de agua y 112,5 g de NaCl (20% p/v) se introdujeron en un reactor de 2 L. Después de la disolución, se añadieron 60,0 g de heparina cruda a la disolución. Después de agitación mecánica durante 30 minutos, el precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 empaquetado con 33,9 g de clarcel. El filtro de vidrio sinterizado se lavó con 120 ml de disolución de NaCl al 20% (p/v). El filtrado obtenido (704 ml) se cargó en un reactor de 2 L y se vertió rápidamente metanol (388 ml), en presencia de agitación

mecánica. Después de agitar durante aproximadamente 2 horas a una temperatura de aproximadamente 20°C, la suspensión se dejó sedimentar toda la noche. El sobrenadante (804 ml) se quitó y se desechó y el precipitado sedimentado se recogió en una disolución de NaCl al 20 % (73,5 g de NaCl en 368 ml de agua). Después de agitar durante 30 minutos, se añadieron rápidamente 385 ml de metanol. Después de agitar durante aproximadamente 1 hora a una temperatura de aproximadamente 20°C, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El sobrenadante (840 ml) se quitó y se desechó y se añadió metanol (400 ml) al precipitado sedimentado. De nuevo, después de agitar durante aproximadamente 1 hora, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas y el sobrenadante (430 ml) se quitó y se desechó. Se añadió metanol (400 ml) al precipitado sedimentado. Después de agitar esta disolución durante 1 hora, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. Después de sedimentar, el precipitado suspendido se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta obtenida se lavó dos veces con 400 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura de aproximadamente 40°C. Después de secar, se obtuvieron 43,7 g de heparina "mejorada". El rendimiento fue 73%.

Los residuos de glicoserina no se ven afectados por estos tratamientos y el porcentaje de glicoserina en la muestra (NI%) fue 2,4.

Ejemplo 2: Heparina "Mejorada" Oxidada con Permanganato de Potasio y Despirogenada

Doce gramos de heparina "mejorada" obtenida como se ha descrito en el ejemplo 1 y 120 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La temperatura de la mezcla se ajustó a 40°C con agitación magnética. El pH de la mezcla se ajustó a $8,7 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 80°C y se añadieron 0,96 g de KMnO_4 sólido. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se dejó flocular durante 1 hora a 80°C. Se añadió carcel (1,2 g). Después de agitar durante 15 minutos, el precipitado se recogió por filtración a través de un filtro de vidrio sinterizado número 3 empaquetado con 15 g de clarcel. El precipitado se lavó con 25 ml de agua a 60°C y con 25 ml de agua a 20°C. El filtrado (180 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 1,8 g de NaCl al filtrado con el fin de obtener una disolución al 1 %. El pH se ajustó a aproximadamente $11,2 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 45°C durante 2 horas y se dejó con agitación lenta a aproximadamente 20°C durante aproximadamente 12 horas. Esta disolución se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 y el embudo se lavó con 15 ml de disolución de NaCl al 20 % (p/v). El filtrado se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 1,2 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. El medio de reacción se dejó con agitación lenta a aproximadamente 20°C durante aproximadamente 12 horas. El pH se ajustó a $6,2 \pm 0,3$ por la adición de una disolución 6N HCl y la concentración de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de 1 μm y la membrana se lavó con 5 ml de agua. El filtrado (204 ml) reunido de esta filtración se puso en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se añadió rápidamente metanol (163 ml) en presencia de agitación magnética. Después de agitar vigorosamente durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El sobrenadante (295 ml) se quitó y se desechó y se añadió metanol (70 ml) al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante 3 horas. El sobrenadante (80 ml) se quitó y se desechó y se añadió metanol (60 ml) al precipitado sedimentado. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta de esta filtración se lavó con dos partes de 25 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura de aproximadamente 40°C. Después de secar, se obtuvieron 10,33 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 86,1 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

NI% Glicoserina = 0

Actividad anti-Xa = 203,5 IU/mg

Ejemplo 3: Heparina "Mejorada" Sin Oxidación y Con Despirogenación

Doce gramos de heparina "mejorada" obtenida como se ha descrito en el ejemplo 1 y 120 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadió NaCl (1,21 g) con el fin de obtener una disolución al 1 %. El pH se ajustó a aproximadamente $11,2 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 45°C durante 2 horas y se dejó con agitación lenta a una temperatura de aproximadamente 20°C durante aproximadamente 12 horas. La disolución se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 y el embudo se lavó con 10 ml de disolución de NaCl al 20 % (p/v). El filtrado obtenido se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 1,2 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. El medio de reacción se agitó lentamente a una temperatura de aproximadamente 20°C durante 12 horas. El pH se ajustó a $6,2 \pm 0,3$ por la adición de una disolución 6N HCl y la concentración de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de 1 μm . El filtrado (138 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadió rápidamente metanol (110 ml) en presencia de agitación magnética. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El sobrenadante (195 ml) se quitó y se desechó y se añadió metanol (55 ml) al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30

minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 1 hora. El sobrenadante (57 ml) se quitó de nuevo y se desechó. Se añadió metanol (55 ml) al precipitado sedimentado. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El precipitado se recogió por filtración a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 y la torta obtenida se lavó con 2 partes de 25 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura de aproximadamente 40°C. Después de secar, se obtuvieron 11,12 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 92,7 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

NI% Glicoserina= 2,4

Actividad anti-Xa = 203,7 IU/mg

Ejemplo 4: Heparina "Mejorada" Sin Oxidación y Sin Despirogenación

12 g de heparina "mejorada" obtenida como se ha descrito en el ejemplo 1 y 120 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. El pH se llevó a aproximadamente 11,2 ± 0,3 por la adición de 1N hidróxido de sodio y se añadieron 1,2 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno. El medio de reacción se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. El pH se llevó de nuevo a 6,2 ± 0,3 por la adición de una disolución 6N HCl y la titulación de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de 1 µm y se lavó con 2 ml de agua. El filtrado obtenido (133 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se añadió rápidamente metanol (106 ml) a éste en presencia de agitación magnética. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar hasta el día siguiente. El sobrenadante se quitó y se desechó (190 ml) y se añadieron 50 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante 4 horas. El sobrenadante se quitó y se desechó de nuevo (48 ml) y se añadieron 50 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. Después de sedimentar, el precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta obtenida se lavó con dos partes de 25 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura en la región de 40°C. Después de secar, se obtuvieron 10,48 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 87,35 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

NI% Glicoserina= 2,4

Actividad anti-Xa = 209,5 IU/mg

Ejemplo 5: Heparina "Mejorada" Con Oxidación y Sin Despirogenación

12 g de heparina "mejorada" obtenida según el ejemplo 1 y 120 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La mezcla se llevó a 40°C en presencia de agitación magnética. El pH se llevó a 8,7 ± 0,3 por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a aproximadamente 80°C y se añadieron 0,96 g de KMnO₄ sólido al medio de reacción. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se dejó flocular durante 1 hora a 80°C. Se añadieron 1,2 g de clarcel. Después de agitar durante 15 minutos, el precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 empaquetado con 15 g de clarcel. Éste se lavó sucesivamente con 25 ml de agua a 60°C y con 25 ml de agua a 20°C. El filtrado (178 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron a éste 1,2 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. La mezcla de reacción se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. El pH se llevó de nuevo a 6,2 ± 0,3 por la adición de una disolución 6N HCl y la titulación de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de 1 µm y se lavó con 2 ml de agua. El filtrado obtenido (192 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se añadieron rápidamente 154 ml de metanol a éste, en presencia de agitación magnética. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar hasta el día siguiente. El sobrenadante se quitó y se desechó (283 ml) y se añadieron 60 ml de metanol al sedimento precipitado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante 4 horas. El sobrenadante se quitó y se desechó de nuevo (58 ml) y se añadieron otros 60 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta obtenida se lavó con dos partes de 25 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura en la región de 40°C. Después de secar, se obtuvieron 10,31 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 85,9 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

NI% Glicoserina= 0

Actividad anti-Xa = 210,3 IU/mg

Ejemplo 6: Heparina "Mejorada" Oxidada en 8% KMnO_4 a 80°C

10 g de heparina "mejorada" obtenida según el ejemplo 1 y 100 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La mezcla se llevó a 40°C en presencia de agitación magnética. El pH se llevó a $8,7 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 80°C y se añadieron a él 0,80 g de KMnO_4 sólido. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se dejó flocular durante 1 hora a 80°C. Se añadió 1,0 g de clarcel. Después de agitar durante 15 minutos, el precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 empaquetado con 15 g de clarcel. Éste se lavó sucesivamente con 25 ml de agua a 60°C y con 25 ml de agua a 20°C. El filtrado obtenido (152 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 1,5 g de NaCl a éste con el fin de obtener una disolución al 1 %. El pH se llevó a aproximadamente $11 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a aproximadamente 45°C durante 2 horas y se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. La disolución se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. El filtrado obtenido se introdujo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadió a éste 1,0 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. El medio de reacción se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. El pH se llevó de nuevo a $6,2 \pm 0,3$ con una disolución 6N HCl y la titulación de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de 1 μm y la mitad del filtrado (70 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron rápidamente a éste 56 ml de metanol, en presencia de agitación magnética. Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla se dejó sedimentar. El sobrenadante se quitó y se desechó (118 ml) y se añadieron 60 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El sobrenadante se quitó y se desechó (54 ml) y se añadieron 50 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta obtenida se lavó con dos partes de 25 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura en la región de 40°C. Después de secar, se obtuvieron 2,80 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 63,3 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

NI% Glicoserina= 0,0

Ejemplo 7: Heparina "Mejorada" Oxidada en 4% KMnO_4 a 80°C

10 g de heparina "mejorada" obtenida según el ejemplo 1 y 100 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La mezcla se llevó a 40°C en presencia de agitación magnética. El pH se llevó a $8,7 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 80°C y se añadieron a éste 0,40 g de KMnO_4 sólido. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se dejó flocular durante 1 hora a 80°C. Se añadió a ésta 1,0 g de clarcel. Después de agitar durante 15 minutos, el precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 empaquetado con 15 g de clarcel. Éste se lavó sucesivamente con 25 ml de agua a 60°C y con 25 ml de agua a 20°C. El filtrado obtenido (158 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron a éste 1,6 g de NaCl con el fin de obtener una disolución al 1 %. El pH se llevó a aproximadamente $11 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 45°C durante 2 horas y se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. La disolución se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. El filtrado se introdujo de nuevo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadió a éste 1,0 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. El medio de reacción se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. El pH se llevó de nuevo a $6,2 \pm 0,3$ con una disolución 6N HCl y la titulación de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de 1 μm . El filtrado (152 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se añadieron a éste rápidamente 122 ml de metanol, en presencia de agitación magnética. El sobrenadante se quitó y se desechó (251 ml) y se añadieron 100 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El sobrenadante se quitó y se desechó (97 ml) y se añadieron 100 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta obtenida se lavó con dos partes de 30 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura en la región de 40°C. Después de secar, se obtuvieron 6,4 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 71 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

NI% Glicoserina= 0,0

Ejemplo 8: Heparina "Mejorada" Oxidada en 8% de KMnO_4 a 40°C

10 g de heparina "mejorada" obtenida según el ejemplo 1 y 100 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La mezcla se llevó a 40°C en presencia de agitación magnética. El pH se llevó a $8,7 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 40°C y se añadieron a éste 0,80 g de KMnO_4 sólido. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se dejó flocular durante 1 hora a 80°C. Se añadió a ésta 1,0

g de clarcel. Después agitar durante 15 minutos, el precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 empaquetado con 15 g de clarcel. Éste se lavó secuencialmente con 25 ml de agua a 60°C y 25 ml de agua a 20°C. El filtrado obtenido (142 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 1,42 g de NaCl con el fin de obtener una disolución al 1 %. El pH se llevó a aproximadamente $11 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 45°C durante 2 horas y se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. La disolución se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. El filtrado se introdujo de nuevo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadió a éste 1,0 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. El medio de reacción se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. El pH se llevó de nuevo a $6,2 \pm 0,3$ con una disolución 6N HCl y la titulación de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de 1 μm y la mitad del filtrado (80 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadieron rápidamente a éste 64 ml de metanol, en presencia de agitación magnética. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar. El sobrenadante se quitó y se desechó (131 ml) y se añadieron 60 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El sobrenadante se quitó y se desechó (52 ml) y se añadieron 50 ml de metanol al precipitado sedimentado. La suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta obtenida se lavó con dos partes de 25 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura en la región de 40°C. Después de secar, se obtuvieron 2,3 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 54 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

NI% Glicoserina= 0,0

Ejemplo 9: Heparina "Mejorada" Oxidada Con 8% KMnO_4 a 60°C

10 g de heparina "mejorada" obtenida según el ejemplo 1 y 100 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La mezcla se llevó a 40°C con agitación magnética. El pH se llevó a $8,7 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 60°C y se añadieron a éste 0,80 g de KMnO_4 sólido. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se dejó flocular durante 1 hora a 80°C. Se añadió 1,0 g de clarcel. Después agitar durante 15 minutos, el precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 empaquetado con 15 g de clarcel. Éste se lavó con 25 ml de agua a 60°C y 25 ml de agua a 20°C. El filtrado obtenido (150 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadieron 1,5 g de NaCl con el fin de obtener una disolución al 1 %. El pH se llevó a aproximadamente $11 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 45°C durante 2 horas y se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. La disolución se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. El filtrado se introdujo de nuevo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadió 1,0 ml de una disolución acuosa de peróxido de oxígeno al 30%. El medio de reacción se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. El pH se llevó de nuevo a $6,2 \pm 0,3$ con una disolución 6N HCl y la titulación de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de 1 μm y la mitad del filtrado (70 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadieron rápidamente a éste 56 ml de metanol, en presencia de agitación magnética. El sobrenadante se quitó y se desechó (118 ml) y se añadieron 60 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la mezcla se dejó sedimentar durante aproximadamente 12 horas. El sobrenadante se quitó y se desechó (54 ml) y se añadieron 50 ml de metanol al precipitado sedimentado. La suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta obtenida se lavó con dos partes de 25 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura en la región de 40°C. Después de secar, se obtuvieron 3,12 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 68 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

NI% Glicoserina= 0,0

Ejemplo 10: Heparina "Mejorada" Oxidada en 2% KMnO_4 a 80°C

10 g de heparina "mejorada" obtenida anteriormente y 100 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La mezcla se llevó a 40°C en presencia de agitación magnética. El pH se llevó a $8,7 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 80°C y se añadieron a éste 0,16 g de KMnO_4 sólido. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se dejó flocular durante 1 hora a 80°C. Se añadió 1,0 g de clarcel. Después agitar durante 15 minutos, el precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 empaquetado con 15 g de clarcel. Éste se lavó con 25 ml de agua a 40°C y 25 ml de agua a 20°C. El filtrado (114 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadieron 1,14 g de NaCl con el fin de obtener una disolución al 1 %. El pH se llevó a aproximadamente $11 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 45°C durante 2 horas y se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. La disolución se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. El filtrado se introdujo de nuevo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron a éste 0,8 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. El medio de reacción se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de

20°C durante 12 horas. El pH se llevó de nuevo a $6,2 \pm 0,3$ con una disolución 6N HCl y la titulación de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de $1 \mu\text{m}$ y la mitad del filtrado (75 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadieron rápidamente 60 ml de metanol, en presencia de agitación magnética. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la mezcla se dejó sedimentar. El sobrenadante se quitó y se desechó (120 ml) y se añaden 50 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la mezcla se dejó sedimentar. El sobrenadante se quitó y se desechó (38 ml) y se añadieron 40 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la suspensión se dejó sedimentar. El sobrenadante se quitó y se desechó (27 ml) y se añadieron 30 ml de metanol al precipitado sedimentado. La suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta obtenida se lavó con dos partes de 25 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura en la región de 40°C. Después de secar, se obtuvieron 2,61 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 72 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

NI% Glicoserina= 0,8

15 Ejemplo 11: Heparina "Mejorada" Oxidada en 2% KMnO_4 a 60°C

10 g de heparina "mejorada" obtenida según el ejemplo 1 y 100 ml de agua destilada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La mezcla se llevó a 40°C en presencia de agitación magnética. El pH se llevó a $8,7 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 60°C y se añadieron a éste 0,16 g de KMnO_4 sólido. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se dejó flocular durante 1 hora a 60°C. Se añadió 1,0 g de clarcel. Después de agitar durante 15 minutos, el precipitado en suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3 empaquetado con 15 g de clarcel. Éste se lavó con dos partes de 20 ml de agua a 40°C. El filtrado (129 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadieron a éste 1,29 g de NaCl con el fin de obtener una disolución al 1 %. El pH se llevó a aproximadamente $11 \pm 0,3$ por la adición de 1N hidróxido de sodio. El medio de reacción se calentó a 45°C durante 2 horas y se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. La disolución se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. El filtrado se introdujo de nuevo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron a éste 0,8 ml de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %. El medio de reacción se dejó con agitación lenta a una temperatura en la región de 20°C durante 12 horas. El pH se llevó de nuevo a $6,2 \pm 0,3$ con una disolución 6N HCl y la titulación de NaCl se ajustó a 3%. Esta disolución se filtró a través de una membrana con una porosidad de $1 \mu\text{m}$ y la mitad del filtrado (75 ml) se puso en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadieron rápidamente a éste 60 ml de metanol, en presencia de agitación magnética. El sobrenadante se quitó y se desechó (120 ml) y se añadieron 50 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la mezcla se dejó sedimentar. El sobrenadante se quitó y se desechó (32 ml) y se añadieron 30 ml de metanol al precipitado sedimentado. Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la mezcla se dejó sedimentar. El sobrenadante se quitó y se desechó (26 ml) y se añadieron 30 ml de metanol al precipitado sedimentado. La suspensión se filtra a través de un embudo de vidrio sinterizado número 3. La torta obtenida se lavó dos veces con 25 ml de metanol. El sólido húmedo se secó por filtración y se secó bajo presión reducida (6 kPa), a una temperatura en la región de 40°C. Después de secar, se obtuvieron 2,24 g de heparina "purificada". El rendimiento obtenido fue 62 %.

La composición obtenida tuvo las características siguientes:

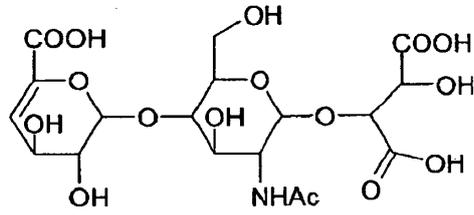
40 NI% Glicoserina= 0,9

Tabla 1: Actividad anti-Xa de las Heparinas Obtenidas Con o Sin Tratamiento Con KmnO_4

Ensayo	Rendimiento	aXa IU/mg	aXa USP/mg	Comentarios
Ejemplo 2	86,1%	203,5	190,5	Tratamiento con KMnO_4 : sí Despirogenación: sí
Ejemplo 3	92,7%	203,7	186,8	Tratamiento con KMnO_4 : no Despirogenación: sí
Ejemplo 4	87,3%	209,5	191	Tratamiento con KMnO_4 : no Despirogenación: no
Ejemplo 5	85,9%	210,3	176,2	Tratamiento con KMnO_4 : sí Despirogenación: no

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto sustancialmente puro que tiene la fórmula:



o

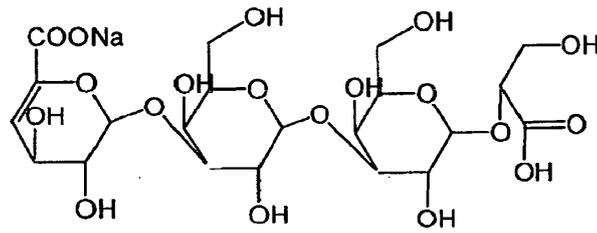


Figura 1



Figura 2

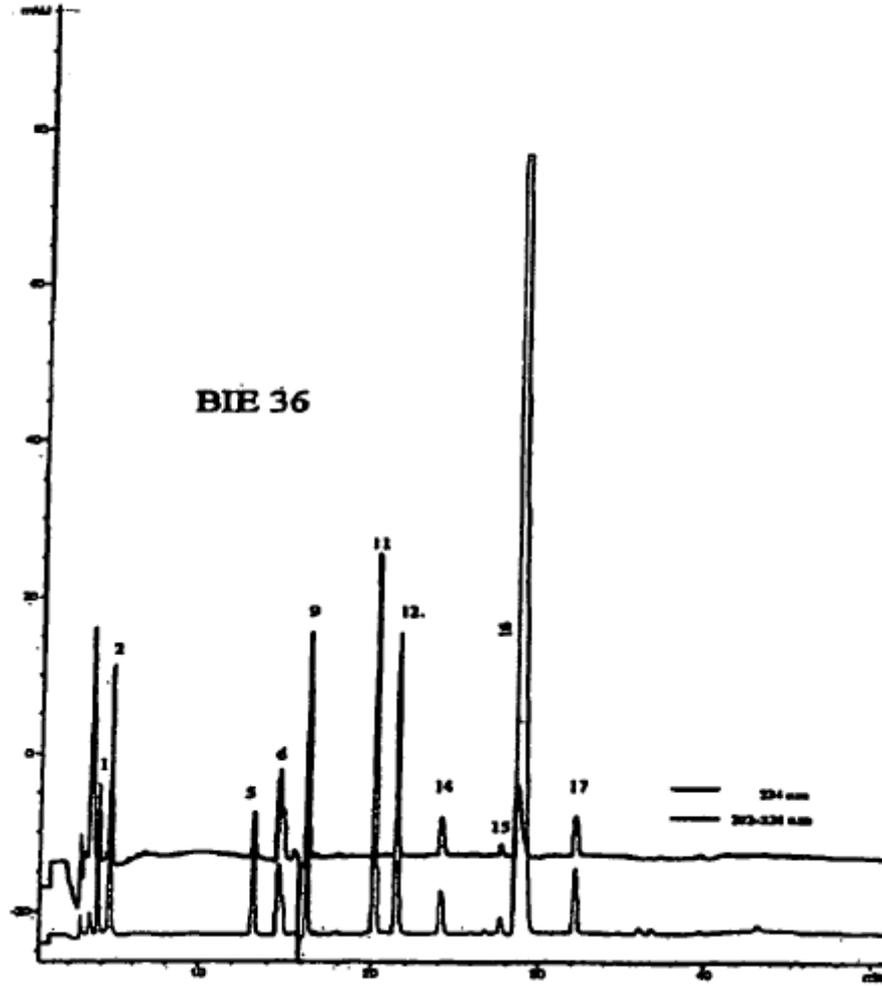


Figura 3

