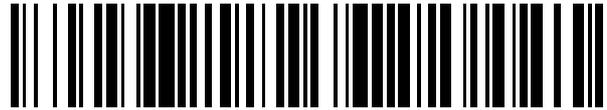


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 705**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2008 E 08782343 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2191278**

54 Título: **Método para medir la concentración de un anticoagulante de glicosaminoglicano**

30 Prioridad:

24.07.2007 US 951504 P

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

26.02.2014

73 Titular/es:

**ACTIVE BIOMATERIALS LLC (100.0%)
11755 Wilshire Blvd., Suite 2000
Los Angeles, CA 90025, US**

72 Inventor/es:

**YAMAMOTO, RALPH y
KIM, YUMI**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 444 705 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 para medir la concentración de un anticoagulante de glicosaminoglicano

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** Las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) son un tipo importante de compuestos antitrombóticos. Las HBPM son seguras y eficaces para la prevención y el tratamiento del tromboembolismo venoso y muchas están aprobadas para estos usos en Europa y América del Norte. Las HBPM tienen la ventaja de que pueden administrarse por vía subcutánea y no necesitan control del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA). Por tanto, las HBPM permiten el tratamiento externo de enfermedades como la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar que anteriormente requerían hospitalización.
- 10 **[0002]** Las HBPM son glicosaminoglicanos compuestos de cadenas de residuos alternos de D-glucosamina y uno de los dos ácidos urónicos: ácido urónico, ya sea ácido glucurónico o ácido idurónico. Mientras que la heparina no fraccionada es una mezcla heterogénea de cadenas de polisacáridos cuyo peso molecular varía entre aproximadamente 3.000 y 30.000, las HBPM (que a menudo están producidas por una depolimerización enzimática o química de heparina) tienen pesos promedios moleculares de aproximadamente 5.000. Todas las heparinas derivan su actividad anticoagulante de la antitrombina activadora (conocida anteriormente como antitrombina III). Esta activación está determinada por una secuencia de pentasacáridos única que se distribuye de manera aleatoria a lo largo de las cadenas de heparinas. Aproximadamente un tercio de las cadenas de heparina no fraccionada, pero solo del 15 al 25 por ciento de las cadenas de las HBPM, contienen la secuencia de pentasacárido.
- 15 **[0003]** Existen diferencias entre la heparina no fraccionada y las HBPM en relación con el efecto inhibitorio sobre el factor Xa y la trombina. Cualquier cadena de heparina que contiene pentasacáridos puede inhibir la acción del factor Xa simplemente ligándose a la antitrombina. No obstante, para inactivar la trombina, la heparina debe formar un complejo terciario, uniéndose tanto a antitrombina como a trombina. Dichos complejos sólo se forman con heparina que contiene pentasacáridos. Puesto que menos de la mitad de las moléculas de HBPM tienen la longitud suficiente para unirse a la antitrombina y a la trombina, las HBPM tienen menos efecto sobre la trombina. Además, la HBPM muestra mejor actividad contra el factor Xa. La importancia relativa de la inhibición del factor Xa y de la inhibición de trombina en la mediación de un efecto antitrombótico varía con el marco clínico, pero existen pruebas de que ambas son necesarias. En consecuencia, ha aumentado el uso de las HBPM para la terapia de enfermedades con un elevado riesgo de coágulos sanguíneos.
- 20 **[0004]** Normalmente, las HBPM se formulan para uso clínico en soluciones acuosas. Debido a su potente efecto anticoagulante, es necesario controlar con exactitud las concentraciones de HBPM durante su formulación y envasado como productos farmacéuticos. Además, la capacidad para medir la concentración de una muestra experimental es fundamental para cualquier programa de desarrollo e investigación que busque inventar nuevos anticoagulantes de glicosaminoglicano.
- 25 **[0005]** Antes de la presente invención, dichas mediciones han necesitado el uso de técnicas basadas en el índice de refracción y absorción de luz UV. No obstante, el uso de la absorción UV es complicada por el hecho de que algunas HBPM producen sólo una señal UV muy débil que es casi indetectable. Además, los métodos UV requieren grandes cantidades de material de prueba lo que los convierte en poco prácticos, especialmente cuando los volúmenes de muestras son restrictivos. Además, la absorción UV no se adapta fácilmente al formato de ensayo rápido cuantitativo de volumen elevado. De modo similar, las técnicas basadas en el índice de refracción carecen de especificidad y pueden producir resultados artificialmente elevados. Dichas inexactitudes son particularmente indeseables cuando se miden los niveles de fármacos.
- 30 **[0006]** Por tanto, continua existiendo la necesidad de determinar métodos que puedan medir la concentración de anticoagulantes de glicosaminoglicano, como las HBPM, en solución que son cuantitativos con precisión, rápidos, de realización sencilla y se prestan al alto rendimiento.
- 35 **[0007]** US20020009782 presenta un método para medir los anticoagulantes de glicosaminoglicanos de bajo peso molecular que utilizan azul de 1,9 dimetilmetileno, lo que determina la absorbencia de la muestra y compara los resultados con un estándar de referencia. El documento también muestra métodos para obtener anticoagulantes de glicosaminoglicano de bajo peso molecular.
- 40 **[0008]** US20020009782 presenta un método para medir los anticoagulantes de glicosaminoglicanos de bajo peso molecular que utilizan azul de 1,9 dimetilmetileno, lo que determina la absorbencia de la muestra y compara los resultados con un estándar de referencia. El documento también muestra métodos para obtener anticoagulantes de glicosaminoglicano de bajo peso molecular.

50 BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La invención ofrece un método para limpiar una unidad de equipo de fabricación utilizada en la preparación de una heparina de bajo peso molecular (HBPM) para obtener una concentración residual aceptable de HBPM que comprende:

- (a) someter la unidad de equipo de fabricación a un protocolo de limpieza;
- (b) obtener la absorbencia de una muestra obtenida de un equipo de fabricación que comprende: (i) tomar una muestra del equipo de fabricación; (ii) hacer reaccionar la muestra con azul de 1,9 dimetilmetileno; y (iii) determinar la absorbencia de la muestra que se ha hecho reaccionar con azul de 1,9 dimetilmetileno;
- (c) determinar la concentración de HBPM en la muestra obtenida del equipo de fabricación mediante la comparación de su absorbencia con las absorbencias de una serie de muestras de HBPM de control en soluciones acuosas de concentraciones conocidas; y
- (d) repetir de modo eventual las etapas (a)-(d) hasta que la concentración de HBPM en la muestra obtenida del equipo de fabricación sea inferior a la concentración residual de HBPM.

[0009] La presente invención también se refiere a un método para limpiar una unidad de equipo de fabricación utilizada en la preparación de una heparina de bajo peso molecular (HBPM) para obtener una concentración residual aceptable de HBPM que comprende:

- (a) someter la unidad de equipo de fabricación a un protocolo de limpieza;
- (b) obtener la absorbencia de una muestra obtenida de un equipo de fabricación que comprende: (i) tomar una muestra del equipo de fabricación; (ii) hacer reaccionar la muestra con azul de 1,9 dimetilmetileno; y (iii) determinar la absorbencia de la muestra que se ha hecho reaccionar con azul de 1,9 dimetilmetileno;
- (c) determinar la concentración de HBPM en la muestra obtenida del equipo de fabricación mediante la comparación de su absorbencia con las absorbencias de una serie de muestras de HBPM de control en soluciones acuosas de concentraciones conocidas; y
- (d) determinar la concentración de HBPM en la muestra obtenida del equipo de fabricación; y
- (e) repetir de modo eventual las etapas (a)-(d) hasta que la concentración de HBPM en la muestra obtenida del equipo de fabricación sea inferior a la concentración residual de HBPM.
- [0010]** El método puede llevarse a cabo según la invención en cualquier recipiente de ensayo adecuado, por ejemplo, en una placa de microvaloración o una cubeta. En consecuencia, el método se realiza de acuerdo con la invención es adecuado, cuantitativo, rápido, de realización sencilla y se presta al alto rendimiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

- [0011]** La FIG. 1 es un diagrama esquemático de una unidad de equipo de fabricación para producir HBPM.
- [0012]** La FIG. 2 representa una curva estándar ilustrativa generada según la invención empleando condroitín-4-sulfato (C-4-S).
- [0013]** La FIG. 3 representa una curva estándar de ejemplo obtenida según la invención generada con enoxaparina y dalteparina (estándares de referencia proporcionados por la Dirección europea de calidad del medicamento).
- [0014]** La FIG. 4A representa la saturación de la curva de respuestas a las dosis de enoxaparina.
- [0015]** La FIG. 4B representa la saturación de la curva de respuestas a las dosis de dalteparina.
- [0016]** La FIG. 5 representa los resultados obtenidos al analizar las HBPM y los no anticoagulantes.
- [0017]** La FIG. 6 representa los resultados generados por el método creativo para soluciones Arixtra®, Lovenox® y Fragmin® de varias concentraciones conocidas.
- [0018]** La FIG. 7 representa la estabilidad de la solución a las 24 horas para Arixtra®, Lovenox® y Fragmin®.
- [0019]** La FIG. 8A representa el primer grupo de resultados obtenidos de un análisis de concentraciones de HBPM residual después de la limpieza de una unidad de equipo de facturación de acuerdo con un protocolo de limpieza.

[0020] La FIG. 8B representa el segundo grupo de resultados obtenidos de un análisis de concentraciones de HBPM residual después de la limpieza de una unidad de equipo de facturación de acuerdo con un protocolo de limpieza.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 **[0021]** La divulgación proporciona un método para medir la concentración de un anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba en una solución acuosa de concentración desconocida que comprende:

10 (a) ensayar una muestra que contiene el anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba que comprende (i) obtener una muestra que contiene el anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba; (ii) hacer reaccionar la muestra con azul de 1,9 dimetilmetileno; y (iii) determinar la absorbencia de la muestra después de la reacción con azul de 1,9-dimetilmetileno; y

(b) determinar la concentración de la muestra que contiene el anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba mediante la comparación de su absorbencia con las absorbencias de una serie de muestras de anticoagulante de glicosaminoglicano de control en soluciones acuosas de concentración conocida.

15 **[0022]** La divulgación también proporciona un método para medir la concentración de un anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba, como, una HBPM, en una solución acuosa que comprende:

20 (a) preparar una curva estándar que comprende: (i) obtener una serie de muestras de un anticoagulante de glicosaminoglicano de control en una solución acuosa de concentración conocida, (ii) hacer reaccionar las muestras de concentración conocida con azul de 1,9 dimetilmetileno, (iii) determinar la absorbencia de las muestras de concentración conocida después su reacción con azul de 1,9 dimetilmetileno;

25 (b) ensayar una muestra que contiene el anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba de concentración desconocida en una solución acuosa que comprende (i) obtener una muestra que contiene el anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba de concentración desconocida; (ii) hacer reaccionar la muestra de concentración desconocida con azul de 1,9 dimetilmetileno; y (iii) determinar la absorbencia de la muestra de concentración desconocida después de la reacción con azul de 1,9-dimetilmetileno; y

30 (c) determinar la concentración de la muestra que contiene el anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba de concentración desconocida mediante la comparación de su absorbencia con las absorbencias de las muestras de curva estándar de anticoagulante de glicosaminoglicano de control en soluciones acuosas de concentración conocida.

[0023] Las absorbencias de las muestras de control pueden obtenerse antes, durante o después de determinar la absorbencia de la muestra del anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba. Por tanto, la comparación puede hacerse, por ejemplo, empleando las absorbencias de una serie de muestras de control histórico de experimentos anteriores.

35 **[0024]** El método puede realizarse de acuerdo con la invención en cualquier recipiente de ensayo adecuado, incluidos, p.ej., el canal de un sistema microelectromecánico (MEMS, por sus siglas en inglés), tubo capilar, placa de microvaloración, cubeta o cualquier otro recipiente adecuado. En consecuencia, puede determinarse la absorbencia a 656 nm de acuerdo con la invención en, p.ej., sin carácter limitativo, un espectrómetro, un colorímetro, un analizador de la coagulación o un lector de placa de microvaloración.

40 **[0025]** El término “ensayar” se refiere a determinar o medir una concentración desconocida o, como alternativa, confirmar una concentración presunta o supuesta.

45 **[0026]** El término “unidad de equipo de fabricación” se refiere a una máquina, recipiente y/o dispositivo, o grupo de máquinas, recipientes y/o dispositivos para su uso en la preparación de anticoagulantes de glicosaminoglicano incluidas, en concreto, las HBPM. La unidad de equipo de fabricación puede incluir un equipo de compuestos, equipo de carga o ambos.

[0027] El término “concentración residual aceptable de HBPM” se refiere a la concentración esperada del protocolo de limpieza utilizado como determinan aquellos expertos en la técnica o una institución u organización de establecimiento de normas.

50 **[0028]** El término “protocolo de limpieza” hace referencia a cualquier método de limpieza adecuado con agua caliente, vapor, aire comprimido, solución de surfactante, solución de agua oxidada y combinaciones de los mismos.

[0029] El término “recipiente de recogida” se refiere a toda o parte de una unidad de equipo de fabricación que almacena sustancias químicas utilizadas en la producción de un medicamento.

[0030] El término “recipiente de mezcla” se refiere a toda o parte de una unidad de equipo de fabricación que mezcla sustancias químicas utilizadas en la producción de un medicamento.

5 **[0031]** El término “recipiente de reacción” hace referencia a toda o parte de una unidad de equipo de fabricación en la que tiene lugar una reacción química de las sustancias químicas utilizadas en la producción de un medicamento.

10 **[0032]** El término “conducto de bajo flujo” hace referencia a toda o parte de una unidad de equipo de fabricación que transporta, con bajo rendimiento, sustancias químicas utilizadas en la producción de un medicamento o el producto (p.ej., un codo).

[0033] El término “conducto de alto flujo” se refiere a toda o parte de una unidad de equipo de fabricación que transporta, con alto rendimiento, sustancias químicas utilizadas en la producción de un medicamento o el producto (p.ej., un tubo recto).

15 **[0034]** El término “dispositivo de administración” se refiere a toda o parte de una unidad de equipo de fabricación que libera sustancias químicas de la unidad.

20 **[0035]** La curva estándar de absorbencias de muestras que tienen concentraciones conocidas de la HBPM se obtiene por un proceso que comprende: (a) preparar una serie de muestras de concentración conocida de HBPM; (b) hacer reaccionar las muestras de concentración conocida de HBPM con azul de 1,9 dimetilmetileno; (c) determinar la absorbencia de las muestras de concentración conocida de HBPM que se ha hecho reaccionar con azul de 1,9 dimetilmetileno; y (d) representar en gráficos las absorbencias obtenidas en (c) en comparación con las concentraciones conocidas de HBPM de las muestras correspondientes.

25 **[0036]** El término “representar en gráficas las absorbencias” se refiere a representarlas en papel y en cualquier otro método matemático adecuado para determinar la relación entre las dos variables, incluidas, pero sin carácter limitativo, la regresión, interpolación, extrapolación hechas de modo manual o a través de un programa informático.

30 **[0037]** Por ejemplo, una curva estándar puede generarse por análisis de regresión lineal realizado sobre la absorbencia de las muestras de concentración conocida después de su reacción con azul de 1,9 dimetilmetileno. En general, la curva estándar se genera empleando al menos 3 controles de concentración de glicosaminoglicano conocida, preferentemente al menos 5 controles de concentración conocida de glicosaminoglicano, más preferentemente al menos 7 controles de concentración conocida de glicosaminoglicano.

[0038] La “concentración” puede expresarse, según la invención, en términos de cualesquiera unidades adecuadas, incluidas, sin carácter limitativo, molar, milimolar, micromolar, porcentaje en peso o volumen, mg/ml o µg/ml.

35 **[0039]** Puede utilizarse cualquier anticoagulante de glicosaminoglicano adecuado en el método de la presente invención. En general, el anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba tiene un peso medio molecular inferior a aproximadamente 10.000 daltons, preferentemente inferior a aproximadamente 7.000 daltons o incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 3.000 daltons. Preferiblemente, el anticoagulante de glicosaminoglicano es una HBPM. Preferentemente, la HBPM es fondaparinux, ardeparina, bemiparina, dalteparina, enoxaparina, nadroparina, reviparina, tinzaparina o intimatán. También se pueden utilizar combinaciones de HBPM. Más preferentemente, la HBPM es fondaparinux (comercializada como Arixtra® por GlaxoSmithKline), dalteparina (comercializada como Fragmin® por Eisai) o enoxaparina (comercializada como Lovenox® por Sanofi-Aventis). La HBPM puede utilizarse opcionalmente en forma de sal, por ejemplo, la sal sódica. Como alternativa, el anticoagulante de glicosaminoglicano de prueba utilizado conforme con la invención puede ser uno o más glicosaminoglicanos hipersulfatados.

40

45

50 **[0040]** Puede utilizarse cualquier glicosaminoglicano estándar o de control según la invención, incluidos, sin carácter limitativo, condroitín-4-sulfato, un estándar de referencia de HBPM de la Dirección europea de calidad del medicamento (EDQM, por sus siglas en inglés) (p.ej., Código del catálogo de EDQM: H0190000) o un estándar de referencia de una calidad similar a la establecida por una organización que determina los estándares. Normalmente, el estándar de referencia para la enoxaparina es 200 mg/vial y para la dalteparina es 250 mg/vial.

[0041] Las soluciones patrón madre (SSS, por sus siglas en inglés) para su uso de acuerdo con la invención incluyen, p.ej., sin carácter limitativo: (1) HBPM (Estándar de referencia de EDQM) a 1mg/ml; (2) una HBPM específica de concentración conocida; y (3) condroitín-4-Sulfato (C-4-S) a 100 mg/ml.

5 **[0042]** Las cantidades adecuadas de C-4-S o HBPM pueden oscilar entre aproximadamente 0,5 µg y aproximadamente 10 µg, preferentemente de aproximadamente 0,7 µg a aproximadamente 7 µg, más preferentemente de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 µg. Las muestras de prueba que pueden utilizarse de acuerdo con la invención incluyen, sin carácter limitativo, aquellas en el intervalo de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 10 µg, preferentemente de aproximadamente 0,7 µg a aproximadamente 7 µg, más preferentemente de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 µg.

10 **[0043]** El volumen de todos los estándares y muestras de prueba puede ajustarse, p.ej., sin carácter limitativo, a 200 µl con agua, preferentemente 150 µl con agua, más preferentemente 100 µg con agua. El ensayo de reacción puede llevarse a cabo con una cantidad precisa de reactivo azul de 1,9 dimetilmetileno (DMMB, por sus siglas en inglés) que oscila de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mililitros (mL) de reactivo DMMB. Los estándares y las muestras de prueba se mezclan con este reactivo durante un periodo de tiempo preciso que es
15 de al menos 30 minutos a una temperatura precisa que es al menos aproximadamente 25 °C.

[0044] Es deseable aislar el complejo de DMMB-glicosaminoglicano de los materiales solubles, como un exceso de DMMB en exceso. Esto se puede hacer, por ejemplo, preparando primero una solución de DMMB en un tampón de formiato pH 3,0 que contiene 5% de etanol y 0,2 M de clorhidrato de guanidina.

20 **[0045]** Como alternativa, la solución de DMMB contiene una cantidad de un tampón similar a formiato, p.ej., sin carácter limitativo, acetato sódico o fosfato citrato, eficaz para estabilizar la solución de prueba del complejo de coloración e impedir la precipitación de glicosaminoglicano. Preferentemente, el tampón utilizado es formiato de sodio a una concentración de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,25 M. Más preferentemente, se emplea un tampón de aproximadamente 0,2 M de formiato de sodio. Cuando se hace de acuerdo con la invención, la reacción entre DMMB y el glicosaminoglicano se completa después de aproximadamente 3
25 segundos a aproximadamente 60 minutos, preferentemente después de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 40 minutos, más preferentemente después de aproximadamente 30 minutos, cuando la reacción se incubaba de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C, preferentemente de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 30 °C, más preferentemente a aproximadamente 25 °C.

30 **[0046]** Se utiliza etanol con bajo pH (p.ej., un pH inferior a aproximadamente 4,0, preferentemente un pH inferior a aproximadamente 3,0, más preferentemente un pH inferior a aproximadamente 2,5, más preferentemente un pH inferior a aproximadamente 2,0) para la precipitación exhaustiva del complejo. Normalmente, los estándares y las muestras de prueba se centrifugan después a aproximadamente 12.500 rpm y se decanta el sobrenadante restante. Se añade un ml de un reactivo de resuspensión adecuado a cada sedimento, el sedimento se vuelve a suspender y se mide la absorbencia con, p.ej., un espectrómetro. El reactivo de la resuspensión contiene un
35 agente caotrópico (p.ej., guanidina, tiourea, isocianato, urea o combinaciones de los mismos). Este reactivo se formula para disociar el complejo de coloración de glicosaminoglicano y para mejorar el perfil de absorción de la coloración libre.

40 **[0047]** Si las lecturas de absorbencia, o lecturas de “densidad óptica” (DO), a 656 nm, son superiores a aproximadamente 1,5, entonces la muestra de prueba debe diluirse y volverse a ensayar. Se prefiere utilizar diluciones al 1/5 o 1/10 de la muestra de prueba. Si las partes alícuotas de prueba inicial de la muestra producen valores de absorbencia inferiores a aproximadamente 0,05 a 656 nm (tras la resta del valor en blanco del reactivo), entonces la muestra contiene menos de 0,2 mg de glicosaminoglicano y la concentración de la muestra debería considerarse antes de volverla a ensayar.

45 **[0048]** Para determinar la absorbencia media neta de las muestras de prueba y de los estándares, los valores medios de absorbencia de los espacios en blanco se restaron de los valores de absorbencia media de los estándares y de las muestras de prueba.

50 **[0049]** “Comparar absorbencias” significa establecer una relación matemática entre los valores de absorbencia de las muestras de prueba y la concentración basada en las absorbencias de las muestras estándar. Esta relación matemática puede establecerse mediante cualquier método apropiado. Por ejemplo, la relación matemática puede establecerse determinando la posición de la absorbencia de prueba en una curva dibujada manualmente de absorbencias de los espacios en blanco de la muestra estándar en comparación a las concentraciones conocidas de muestras estándares. Preferentemente, la relación matemática puede establecerse utilizando el análisis de regresión lineal, conocida entre los expertos en la técnica, basado en los valores de absorbencia corregidos en función del blanco de las muestras estándares.

55 **[0050]** La regresión lineal puede llevarse a cabo de cualquier modo adecuado, incluido, sin carácter limitativo, el uso de programas informáticos como Microsoft Excel®. Cuando se utilizan controles históricos como base de la

comparación, deberían utilizarse normalmente los resultados de al menos 10 controles históricos de concentración conocida de glicosaminoglicano, preferentemente de al menos 25 controles históricos de concentración conocida de glicosaminoglicano, más preferentemente de al menos 50 controles históricos de concentración conocida de glicosaminoglicano, más preferentemente de al menos 100 controles históricos para establecer la relación.

[0051] Un modo de realización de la divulgación puede utilizarse, por ejemplo, para el “análisis durante el proceso”. La concentración de enoxaparina antes de su adición en solución a, p.ej., jeringas, puede determinarse utilizando un método según la divulgación para verificar que la forma sólida de enoxaparina disuelta para obtener la concentración esperada. Otro modo de realización de la divulgación puede utilizarse para analizar la “uniformidad del contenido”. Por ejemplo, la concentración de enoxaparina en jeringas puede determinarse antes de probar la estabilidad acelerada para confirmar que las cantidades iniciales de enoxaparina son uniformes en todas las muestras a utilizar en el estudio.

[0052] La invención proporciona un método para limpiar una unidad de equipo de limpieza utilizada en la preparación de heparina de bajo peso molecular (HBPM) para establecer que se ha obtenido una concentración residual aceptable de HBPM. Preferentemente, la presente invención se aplica al equipo utilizado en la preparación de enoxaparina.

[0053] Un ejemplo de una unidad de equipo de fabricación que puede limpiarse según la presente invención se ilustra en la FIG. 1. La unidad de equipo de fabricación puede incluir un tanque de formulación (10), un tanque del producto (20), agujas de llenado (30) y tubos (40). Estos componentes diversos pueden conectarse mediante tubos adecuados. Como se describe en el presente documento, el montaje completo de los componentes que forman la unidad de equipo de fabricación se le denomina “tren de equipo”. Con respecto a la FIG.1, el tren de equipo incluye el tanque de formulación (10), tanque del producto (20), agujas de llenado (30) y tubos (40), así como otros componentes.

[0054] Puede emplearse cualquier protocolo de limpieza adecuado para limpiar la unidad de equipo de fabricación. Por ejemplo, para limpiar el equipo puede utilizarse: agua purificada, agua caliente, vapor, aire comprimido, solución de surfactante, solución de agua oxidada y combinaciones de los mismos. Cualquier volumen adecuado de solución de limpieza, p.ej., 100 mL, preferentemente 200 mL, más preferentemente superior a 500 mL. El proceso de limpieza puede repetirse una o más veces según necesidad.

[0055] La muestra o muestras obtenidas de la unidad de equipo de fabricación pueden obtenerse de cualquier superficie adecuado de la unidad que incluye, p.ej., la superficie de uno o más de los siguientes: recipiente de recogida (p.ej., tanque), recipiente de mezcla, reactor, dispositivo de mezcla (p.ej., impulsor y vara), conducto de bajo flujo, conducto de alto flujo y dispositivo de administración. Con respecto a la unidad de equipo de fabricación ilustrada en la FIG. 1, las muestras pueden obtenerse del tanque de formulación (10), del tanque del producto (20), de las agujas de llenado (30), de los tubos (40) y/o del codo (50).

[0056] La muestra puede obtenerse mediante cualquier método adecuado, incluidos, p.ej., toma de muestra con hisopo, fregado, aclarado, raspado o barrido de la superficie de la unidad de equipo de fabricación. Se puede utilizar cualquier volumen de sustancia de aclarado, por ejemplo, 5 mL, preferentemente 7 mL, más preferentemente 10 mL y más preferentemente 12 mL.

[0057] La absorbencia de la muestra del equipo de fabricación se obtiene como se explica anteriormente haciendo reaccionar la muestra con azul de 1,9 dimetilmileno y después se determina la absorbencia de la muestra resultante. La concentración de HBPM en la muestra se determina por comparación de su absorbencia con las absorbencias de una serie de muestras de las HBPM de control en soluciones acuosas de concentración conocida. Preferentemente, la absorbencia de la muestra se compara con una curva estándar de absorbencias obtenidas de una serie de muestras que tienen concentraciones conocidas de la HBPM. En base a la comparación de las absorbencias, puede determinarse la concentración de la HBPM en la muestra obtenida de la unidad de equipo de fabricación.

[0058] La curva estándar de absorbencias de muestras que tienen concentraciones conocidas de la HBPM se obtiene a través de un proceso que comprende:

(a) preparar una serie de muestras de concentración conocida de HBPM;

(b) hacer reaccionar las muestras de la concentración conocida de HBPM con azul de 1,9 dimetilmileno;

(c) determinar la absorbencia de las muestras de concentración conocida de HBPM que se han hecho reaccionar con azul de 1,9 dimetilmileno; y

(d) representar en gráficas las absorbencias obtenidas en (c) en comparación con las concentraciones conocidas de HBPM de las muestras correspondientes.

5 **[0059]** La concentración residual aceptable de HBPM puede ser cualquier concentración adecuada de modo que la concentración residual no impacte de modo adverso en el uso del equipo de fabricación en la producción de ningún producto farmacéutico incluidas las HBPM o de cualquier tipo. Normalmente, una concentración de HBPM adecuada es inferior a aproximadamente 7,8 microgramos por pulgada cuadrada del área de superficie. Como alternativa, una concentración residual aceptable sería inferior a aproximadamente 5,0 microgramos por mililitro de muestra, preferentemente inferior a aproximadamente 2,5 microgramos por mililitro de muestra, más preferentemente inferior a aproximadamente 1,8 microgramos por mililitro de muestra, y más preferentemente inferior a aproximadamente 1,0 microgramos por mililitro de muestra.

10 **[0060]** Cuando el método de la invención se utiliza para limpiar enoxaparina como se ilustra en la FIG. 1, las siguientes concentraciones de enoxaparina son aceptables:

TABLA 1

	En base a un tanque de 80 L	En base a un tanque de 10 L	En base a un tanque de 100 L
Tren de equipo (4 in² de hisopo)	31,8 mcg/4 in ²	31,1 mcg/4 in ²	20,4 mcg/in ²
Aguja de llenado (con 5 mL de sustancia de enjuague)	0,986 mcg/mL	0,963 mcg/mL	0,62 mcg/mL
Codo (con 25 mL de sustancia de enjuague)	1,70 mcg/mL	1,67 mcg/mL	1,08 mcg/mL
	Con 2 mL de enjuague		
Aguja de llenado	2,46 mcg/mL	2,41 mcg/mL	1,55 mcg/mL
	Con 10 mL de enjuague		
Codo	4,26 mcg/mL	4,17 mcg/mL	2,70 mcg/mL

15

[0061] Si no se obtiene una concentración residual aceptable de HBPM, se puede repetir el protocolo de limpieza en la unidad de equipo de fabricación una o más veces. Después de cada limpieza posterior, se fija la concentración de la HBPM, como se describe en el presente documento, mediante la determinación de la absorbencia de una muestra después de su reacción con azul de 1,9 dimetilmileno.

20 **[0062]** Los siguientes ejemplos ilustran también la invención pero, por supuesto, no deben interpretarse como limitadores del alcance de la invención.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

[0063] Este ejemplo demuestra la utilidad para determinar la concentración de las HBPM.

25 **[0064]** Las determinaciones de las concentraciones de HBPM de prueba en solución acuosa se hicieron de acuerdo con la invención empleando un sistema de ensayo ilustrativo, el kit de ensayo Blyscan™ (BioColor Ltd., Newtownabbey, Irlanda del Norte).

[0065] Las soluciones patrón madre (SSS, por sus siglas en inglés) se prepararon incluyendo: (1) HBPM (EDQM) en 1 mg/ml; (2) HBPM (EDQM) en 0,04 mg/ml; y (3) Condroitín-4-Sulfato (C-4-S) en 100 µg/ml.

30 **[0066]** Los volúmenes adecuados de las SSS de HBPM o C-4-S se transfirieron a tubos duplicados de microcentrifuga de 1,5 ml para obtener un intervalo estándar de 1-5 µg. Las muestras de prueba se prepararon para obtener preparaciones que contienen el intervalo de 1-5 µg de desconocido.

35 **[0067]** El volumen para todos los estándares y muestras de prueba se ajustó a 100 µl con agua y se añadió 1 ml de reactivo de azul de 1,9 dimetilmileno. Los estándares y muestras de prueba se mezclaron con este reactivo durante 30 minutos a 25 °C. Después se centrifugaron los estándares y muestras de prueba a 10.000 rpm y se decantó el sobrenadante resultante. Se añadió un mililitro de reactivo de resuspensión a cada sedimento, el sedimento se volvió a suspender y se midió la absorbencia a 656 nm con un espectrómetro. También se midió la absorbencia a 656 nm de un blanco que contiene sólo reactivo de resuspensión.

[0068] Con el fin de determinar la absorbencia neta media de las muestras de prueba y de los estándares, se restaron los valores de absorbencia media de los blancos a los valores de la absorbencia media de los estándares y de las muestras de prueba. Las concentraciones se calcularon según la siguiente ecuación:

$$W_i = A_i / m$$

5 en la que W_i es el peso del componente i , A_i es la absorbencia del componente i y m es la pendiente de la curva estándar o la ratio de las pendientes en relación con C-4-S.

[0069] El análisis de regresión lineal se utilizó para construir una curva estándar a partir de los valores de absorbencia corregidos en el blanco.

10 [0070] La utilidad de cualquier ensayo de concentración mejora con una respuesta a las dosis lineal en concentraciones relevantes de estándares adecuados y los objetivos de ensayo. En la Fig. 2 se muestra una curva estándar de ejemplo generada empleando C-4-S. Las estadísticas para esta curva se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

	Ecuación	Pendiente	r²
	$y = 0,2368x + 0,0159$	0,2368	0,9999
	$y = 0,2168x + 0,0281$	0,2168	0,9956
	$y = 0,2292x + 0,0242$	0,2292	0,9994
	$y = 0,2359x + 0,0093$	0,2359	0,9995
	$y = 0,2027x + 0,0147$	0,2027	0,9998
	$y = 0,2105x - 0,0151$	0,2105	0,9994
	$y = 0,2115x - 0,002$	0,2115	1
	Media	0,2205	0,9991
	Desviación estándar (DE)	0,013	0,002
	%RSD (n = 7)	6,1	0,2

15 [0071] Estos datos, que muestran un coeficiente de correlación (r^2) medio de 0,999, indican que existe una relación lineal de respuesta a las dosis para el intervalo examinado de la concentración de C-4-S.

[0072] Las HBPM enoxaparina y dalteparina también producen una relación respuesta a las dosis lineal (FIG. 3). Un análisis estadístico de los resultados presenta una correlación de coeficientes para enoxaparina y dalteparina de 0,9998 y 0,9998, respectivamente, lo que indica que las respuestas a las dosis lineales están presentes.

20 [0073] La Tabla 3 ilustra que el método llevado a cabo según la divulgación produce una respuesta a las dosis lineal. Se estudió la respuesta de linealidad para las HBPM enoxaparina (EDQM), dalteparina (EDQM), Lovenox (comercializada por Aventis), Fragmin® (comercializada por Pharmacia) y Arixtra® (comercializada por Alchemia), así como el condroitín-4-sulfato estándar (BioColor, Ltd.) para concentraciones que oscilan de < 1 µg/ml a 5 µg/ml. En la Tabla 3 se muestra una comparación de las pendientes y los coeficientes de correlación, (*n=4, **n=1, ***n=7). Todos los ejemplos tienen coeficientes de correlación de al menos 0,98 que indican que las relaciones de las respuestas a las dosis lineales están presentes.

25

TABLA 3

Muestra	Pendiente	Coefficiente correlativo
*enoxaparina (EDQM):	0,420 +/- 0,029	$r^2 = 0,9994$
*dalteparina (EDQM):	0,418 +/- 0,026	$r^2 = 0,9990$
**Arixtra®	0,512 +/- 0,029	$r^2 = 0,9996$
**Lovenox®	0,439 +/- 0,010	$r^2 = 0,9990$
**Fragmin®	0,425 +/- 0,018	$r^2 = 0,9995$
***C-4-S	0,238 +/- 0,002	$r^2 = 0,9803$

30 [0074] No obstante, como muestra la FIG. 4, el ensayo se satura a altas concentraciones de HBPM. Las curvas de respuesta a las dosis para enoxaparina (FIG. 4A) y dalteparina (FIG. 4B) se estancan ambas a aproximadamente 10 µg/ml.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

[0075] Este ejemplo demuestra la especificidad del método y la ausencia de interferencia potencial de un no anticoagulante que podría estar en una mezcla de ensayo. Se ensayaron concentraciones casi iguales de las HBPM Fragmin®, Lovenox® y Arixtra® y la proteína de suero ilustrativa no anticoagulante BSA de acuerdo con la divulgación (el sulfato sódico es un control negativo). La albúmina del suero bovino (BSA) se utiliza normalmente como estabilizador de producto. Como se muestra en la FIG. 5, el método distinguió, con lecturas de densidad óptica sustancialmente diferentes, las HBPM de la proteína no anticoagulante BSA.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

[0076] Este ejemplo demuestra la exactitud del método en diferentes concentraciones de tres HBPM. El método se evaluó mediante la determinación de la recuperación en porcentaje de las soluciones “marcadas” de Arixtra®, Lovenox® y Fragmin® añadidas en 50%:100%:150% de reivindicación (FIG. 6). El método ofreció resultados que estaban en el 10% del resultado esperado, lo que indica un grado alto de exactitud.

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

[0077] Este ejemplo demuestra la variabilidad durante un día de un analista único empleando el método un único día. La variabilidad de un día para cada muestra de prueba era inferior al 5%. Este ejemplo también demuestra la variabilidad durante un día menor y reproducibilidad del método entre dos analistas en días diferentes. El método se llevó a cabo como se detalla en el **Ejemplo 1** empleando 2 µg de muestras de Arixtra®, Lovenox® y Fragmin® y los valores de precisión fueron de menos del 10%.

[0078] Los resultados se muestran en las Tablas 4-6.

TABLA 4

Arixtra (2 ug)		Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
1		1,158	0,982	1,219
2		1,086	1,056	1,237
3		1,161	1,022	1,233
4		1,162	1,033	1,233
5		1,145	1,062	1,199
6		1,143	1,020	1,230
Media	(n=6)	1,1425	1,0292	1,2252
DE	(n=6)	0,0288	0,0289	0,0142
%RSD	(n=6)	2,5	2,8	1,2
Media	(n=18)	1,1323		
DE	(n=18)	0,0859		
%RSD	(n=18)	7,6		

TABLA 5

Lovenox (2 ug)		Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
1		0,785	0,789	0,814
2		0,790	0,781	0,827
3		0,787	0,794	0,827
4		0,783	0,780	0,813
5		0,740	0,802	0,822
6		0,807	0,793	0,817
Media	(n=6)	0,7820	0,7898	0,8200
DE	(n=6)	0,0223	0,0084	0,0063
%RSD	(n=6)	2,9	1,1	0,8
Media	(n=18)	0,7973		
DE	(n=18)	0,0215		
%RSD	(n=18)	2,7		

TABLA 6

Fragmin (2 ug)		Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
1		0,908	0,804	0,975
2		0,909	0,784	0,910
3		0,914	0,812	0,954
4		0,918	0,807	0,978
5		0,906	0,784	0,969
6		0,936	0,800	0,981
Media	(n=6)	0,9152	0,7985	0,9612
DE	(n=6)	0,0111	0,0119	0,0268
%RSD	(n=6)	1,2	1,5	2,8
Media	(n=18)	0,8916		
DE	(n=18)	0,0725		
%RSD	(n=18)	8,1		

[0079] La desviación estándar relativa (%RSD) osciló entre sólo 2,7% y 8,1%, lo que demuestra la adaptabilidad del método a los múltiples usuarios y la reproducibilidad de los métodos durante múltiples rondas.

5 EJEMPLO DE REFERENCIA 4

[0080] Este ejemplo demuestra la utilidad para determinar los anticoagulantes comerciales.

[0081] Las dosis comerciales de anticoagulante con concentraciones marcadas se obtuvieron y sus concentraciones se determinaron empleando los métodos de la presente invención y C-4-S para generar la curva estándar. Se analizó una dosis comercial de Arixtra® en una jeringa con la concentración marcada de 10 mg/0,8 ml. La concentración media determinada por el análisis repetido con el método de la invención (n=6) fue 10,3 mg/0,8 ml o 100,3% de la concentración reivindicada. Una dosis comercial de Fragmin® en una jeringa con la concentración marcada de 48 mg/0,3 ml también se analizó. La concentración media determinada por el análisis repetido con el método de la presente divulgación (n=6) fue 51,8 mg/0,3 ml o 107% de la concentración reivindicada. Además, se analizó una dosis comercial de Lovenox® en una jeringa con la concentración marcada de 100 mg/ml. La concentración media determinada por el análisis repetido con el método de la presente divulgación (n=6) fue 103,9 mg/ml o 103,9% de la concentración reivindicada.

[0082] Además, se obtuvieron las dosis comerciales de los anticoagulantes enoxaparina y dalteparina con concentraciones marcadas y se determinaron sus concentraciones empleando los métodos de la presente divulgación, los estándares del EDQM para enoxaparina y dalteparina, respectivamente, se utilizaron para generar las curvas estándares. La dosis de enoxaparina, marcada como "100 mg/ml", se midió empleando el método de la presente divulgación y mostró una concentración de 99,6 +/- 0,8 mg/ml. La dosis de dalteparina, indicada en la marca para tener una concentración de 48 mg/0,3 ml, se midió empleando el método de la presente divulgación y mostró una concentración de 51,4 +/- 0,4 mg/ml.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

[0083] Este ejemplo demuestra la adaptabilidad del método para el procesamiento por lotes. Para un ensayo es mejor permitir el procesamiento por lotes. Éste se ve facilitado por la capacidad para estabilizar las muestras para un ensayo final en otro momento posterior.

[0084] La FIG. 7 muestra los resultados del método cuando la densidad óptica se lee inmediatamente en comparación con una lectura analizada después de "estar recogida" 24 horas. Los resultados prueban que no existe efecto a partir de las 24 horas de estar "recogidas". En consecuencia, el método ofrece estabilidad de la muestra o de la solución de prueba almacenada antes de llevar a cabo las rondas de los ensayos por lotes (p.ej., lecturas DO).

[0085] En conjunto, los ejemplos 1-5, *inter alia*, muestran que el método de la presente divulgación es útil con una serie de anticoagulantes y de reactivos estándares diferentes.

35 EJEMPLO DE REFERENCIA 6

[0086] Este ejemplo demuestra que hay disminuciones en HBPM: fijación del colorante relacionada con cambios en el contenido de la sulfatación, peso molecular y bioactividad. Aunque no se pretende seguir ninguna teoría, estos resultados son congruentes con el método que funciona con la reacción de azul de metileno.

TABLA 7

	<u>Control</u>	<u>0,1N NaOH</u>	<u>1,0N</u>
Ensayo de HBPM (% de control)	100%	73%	20%
Desulfación (ppm) +/-3.2	1,13+/-0.4	43,2+/-2,6	160,6
Peso molecular (% de control)	100%	89%	78%
Anti Factor Xa (% de control)	100%	82%	7%

EJEMPLO 7

5 **[0087]** Este ejemplo muestra la presente invención de limpieza de equipo de fabricación utilizado en la preparación de una heparina de bajo peso molecular, específicamente la enoxaparina, para obtener una concentración residual aceptable de enoxaparina.

10 **[0088]** Después de utilizar una unidad de equipo de fabricación para producir enoxaparina, se completó un protocolo de limpieza adecuado en el equipo. Se tomó una muestra con hisopo para determinar la cantidad de enoxaparina recuperable de la muestra tomada con hisopo del tren de equipo de acero inoxidable. El protocolo de limpieza se designa para obtener una concentración de enoxaparina inferior al límite máximo permitido de 31,1 µg/4 in².

15 **[0089]** Primero, se preparó un hisopo de muestra de acuerdo con las siguientes etapas: (1) se preparó una solución de 0,622 mg/ml de enoxaparina; (2) 50 µl de la solución se extendieron uniformemente sobre una muestra de material para ensayo de acero inoxidable de modo que ésta contiene 31,1 µg de enoxaparina; (3) se secó la muestra para ensayo y se tomaron muestras con un hisopo ya húmedo (en agua); (4) el hisopo se transfirió a 10 mL de agua y se agitó y (5) se transfirió 1 ml a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, se secó en un concentrador Speed Vac y se removió en 100 µl de agua. La muestra, preparada de este modo, contenía una cantidad de enoxaparina igual 3,11 µg. Se preparó un control según el siguiente procedimiento: (1) se preparó una solución de enoxaparina de 3,11 mg/ml y (2) se transfirió 1,0 ml a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, se secó y se removió en 100 µl de agua. El control, preparado de ese modo, también contenía una cantidad de enoxaparina de 3,11 µg.

25 **[0090]** El hisopo de prueba y el hisopo de control fueron analizados de acuerdo con la presente invención. Se detectaron 3,11 µg de enoxaparina, lo que confirmó que 31,1 µg estaban presentes en la muestra completa de 10 ml. Este ensayo indica que una cantidad de enoxaparina igual al límite permitido se detectó al tomar muestras con hisopo del acero inoxidable y realizar el ensayo según la presente invención. Los resultados se representan en las dos primeras columnas del gráfico de la FIG. 8A. Se realizó un ensayo idéntico el segundo día y los resultados fueron los mismos (véanse las dos primeras columnas de la FIG. 8B).

30 **[0091]** Se llevó a cabo un ensayo similar para mostrar la cantidad de sustancia de enjuague recuperable de una agua de enjuague de 25 ml de un codo de acero inoxidable (véase FIG. 1) con una concentración máxima permitida de 1,67 µg/ml. Se preparó una muestra de acuerdo con las siguientes etapas: (1) se preparó una solución de 25 ml que tiene una concentración de enoxaparina de 1,67 µg/ml y (2) se transfirió 1 ml a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, se secó en un concentrador Speed Vac y se agitó en 100 µl de agua. La muestra, preparada de ese modo, contenía 1,67 µg de enoxaparina. Se preparó un control en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml que contenía 1,67 µg de enoxaparina en 100 µl de agua. Los dos tubos se ensayaron según la presente invención. En ambos, se detectaron 1,67 µg de enoxaparina. Este ensayo demuestra que la presente invención puede detectar una cantidad de enoxaparina igual al nivel permitido en 25 ml de agua de enjuague. Los resultados se representan en las dos segundas columnas del gráfico de la FIG. 8A. Se llevó a cabo un ensayo idéntico el segundo día y los resultados fueron los mismos (véanse las dos segundas columnas de la FIG. 8B).

40 **[0092]** Finalmente, se llevó a cabo un ensayo para demostrar la cantidad de enoxaparina recuperable de una muestra de 5 ml de una aguja de llenado de acero inoxidable (véase FIG. 1) con una cantidad máxima permitida de 0,963 µg/ml. Se transfirió 1,0 ml a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, se secó y se agitó en 100 µl de agua. Esta muestra se ensayó de acuerdo con la presente invención y se detectaron 0,963 µg de enoxaparina. Lo que indica que la presente invención puede detectar una cantidad de enoxaparina igual al nivel máximo permitido en una sustancia de enjuague de 5 ml. Los resultados se representan en la última columna del gráfico en la FIG. 8A. Se practicó un ensayo idéntico el segundo día y los resultados fueron los mismos (véase la última columna de FIG. 8B).

50 **[0093]** El uso de los artículos “un/una” y “el/la” y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse como que engloban el singular y el plural, a no ser que se indique lo contrario o fueran claramente contradictorios con el contexto. Los términos “comprender”, “tener”, “incluir” y “contener” deben interpretarse como términos de

5 significado amplio (es decir, "incluir, sin carácter limitativo") a no ser que se indique lo contrario. La enumeración de intervalos de valores en este documento tiene la mera intención de servir como método abreviado de referirse individualmente a cada valor por separado del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor independiente que se incluye en el método como si se enumeraran por separado individualmente en el documento. Todos los métodos descritos en este documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a no ser que se indique lo contrario o se contradiga claramente con el contexto. El uso de cualquier ejemplo o de todos los ejemplos, o el lenguaje para referirse a estos (p.ej., "como") utilizado aquí, está destinado básicamente a mejorar la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. No debe interpretarse nada en el método como indicación de que cualquier elemento no reivindicado es esencial en la práctica de la invención.

10 **[0094]** Los modos de realización preferidos de la invención se describen en el presente documento, incluida la mejor forma conocida por los inventores para llevar a cabo la invención. Variaciones de estos modos de realización preferidos se pondrán de manifiesto para los expertos en la materia al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los profesionales empleen dichas variaciones como sea apropiado y pretenden que practiquen la invención de otra manera diferente a la descrita en el presente documento.

Reivindicaciones

1. Un método de limpieza de una unidad de equipo de fabricación utilizada en la preparación de heparina de bajo peso molecular (HBPM) para obtener una concentración residual aceptable de HBPM que comprende:
 - 5 (a) someter la unidad de equipo de fabricación a un protocolo de limpieza;
 - (b) obtener la absorbencia de una muestra obtenida del equipo de fabricación, que comprende las siguientes etapas:
 - (i) tomar una muestra del equipo de fabricación;
 - (ii) hacer reaccionar la muestra con azul de 1,9 dimetilmetileno; y
 - 10 (iii) determinar la absorbencia de la muestra que se ha hecho reaccionar con azul de 1,9 dimetilmetileno;
 - (c) determinar la concentración de HBPM en la muestra obtenida del equipo de fabricación mediante la comparación de su absorbencia con las absorbencias de una serie de muestras de HBPM de control en soluciones acuosas de concentraciones conocidas; y
 - 15 (d) repetir de modo eventual las etapas (a)-(c) hasta que la concentración de HBPM en la muestra obtenida del equipo de fabricación sea inferior a la concentración residual aceptable de HBPM.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las absorbencias se determinan en una placa de microvaloración o una cubeta.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que la HBPM de prueba tiene un peso medio molecular inferior a aproximadamente 10.000 daltons.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la HBPM de prueba tiene un peso medio molecular inferior a aproximadamente 7.000 daltons.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que la HBPM de prueba tiene un peso medio molecular inferior a aproximadamente 3.000 daltons.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la heparina de bajo peso molecular es seleccionada del grupo que consta de: ardeparina, bemiparina, dalteparina, enoxoparina, fondaparinux, nadroparina, reviparina, tinzaparina o intimatán, o combinaciones de las mismas.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en el que en la etapa (c) la absorbencia de la muestra de HBPM se compara con una curva estándar de absorbencias obtenida de varias pruebas que tienen concentraciones conocidas de HBPM.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la curva estándar de absorbencias de muestras que tienen concentraciones conocidas de HBPM se obtiene mediante un proceso que comprende:
 - (a) preparar una serie de muestras de concentración conocida de HBPM;
 - 35 (b) hacer reaccionar las muestras de concentración conocida de HBPM con azul de 1,9 dimetilmetileno;
 - (c) determinar la absorbencia de las muestras de concentración conocida de HBPM que se han hecho reaccionar con azul de 1,9 dimetilmetileno; y
 - 40 (d) representar en gráficas las absorbencias obtenidas en (c) en relación con las concentraciones conocidas de HBPM de las muestras correspondientes.
9. El método de la reivindicación 1, en el que una serie de muestras se obtienen del equipo de fabricación, en el que varias muestras obtenidas de la unidad de equipo de fabricación se obtienen de la superficie de uno o más recipientes de recogida, un recipiente de mezcla, un recipiente de reacción, un conducto de bajo flujo, un conducto de alto flujo y un dispositivo de administración.

10. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración residual aceptable de HBPM es inferior a aproximadamente 7,8 microgramos por pulgada cuadrada de muestra.
11. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración residual aceptable de HBPM es inferior a aproximadamente 1,0 microgramos por mililitro de muestra.
- 5 12. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración residual aceptable de HBPM es inferior a aproximadamente 1,8 microgramos por mililitro de muestra.

FIG. 1

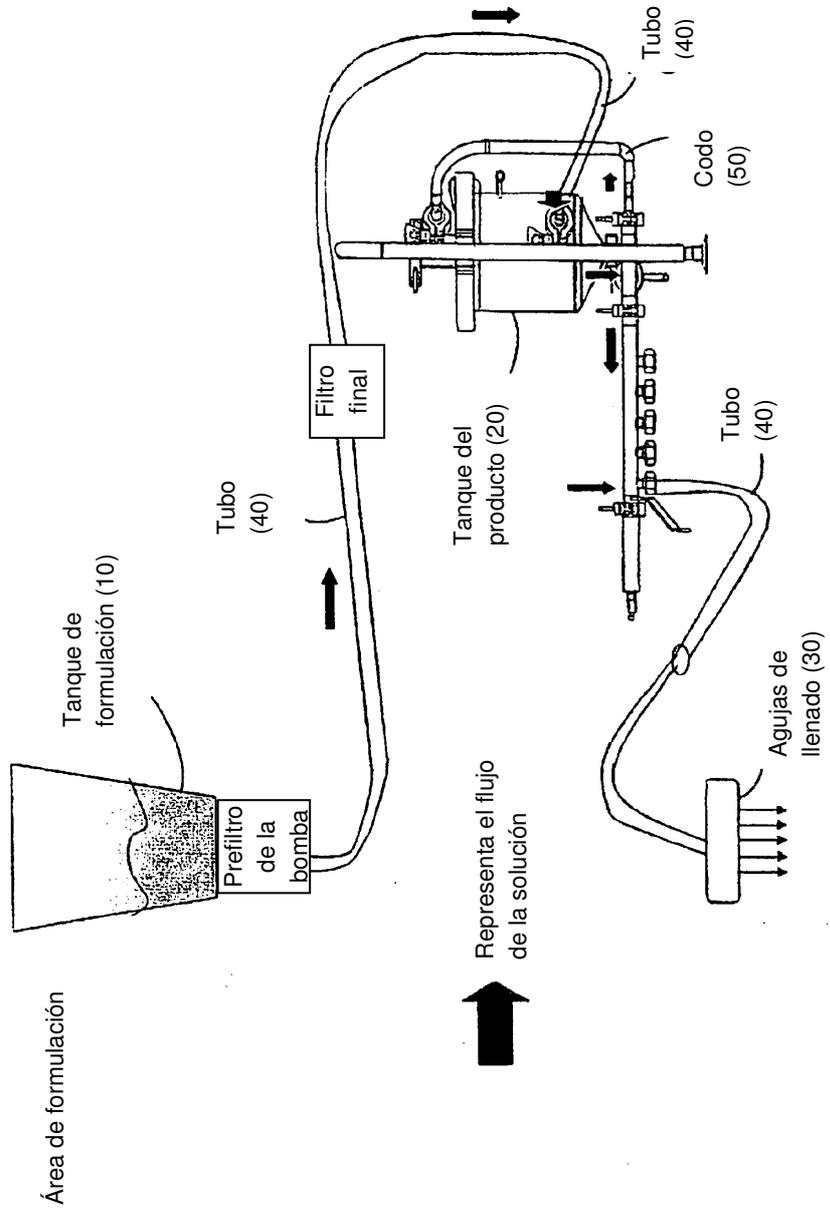


FIG. 2

Curva estándar de condroitín-4-sulfato (n=7)

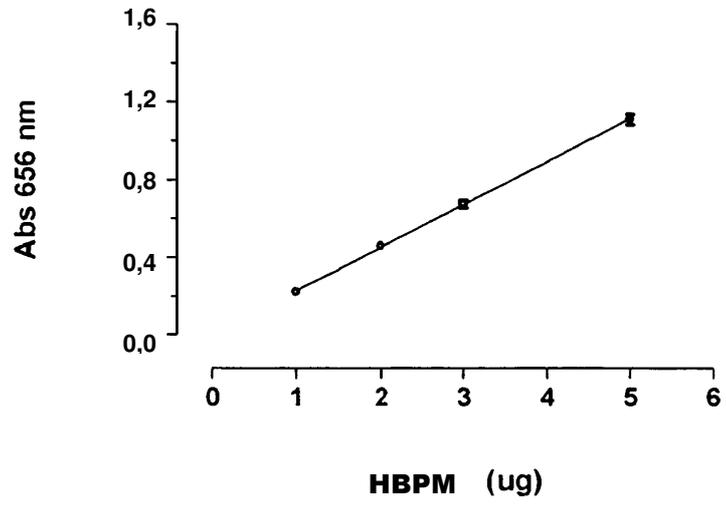


FIG. 3

Curvas estándares (enoxaparina y dalteparina) de los estándares del EDQM

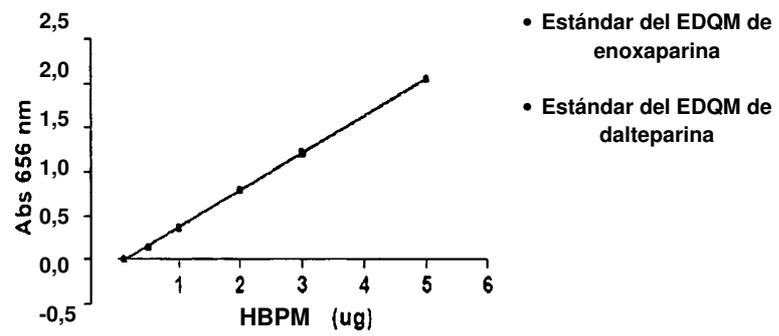


FIG. 4A

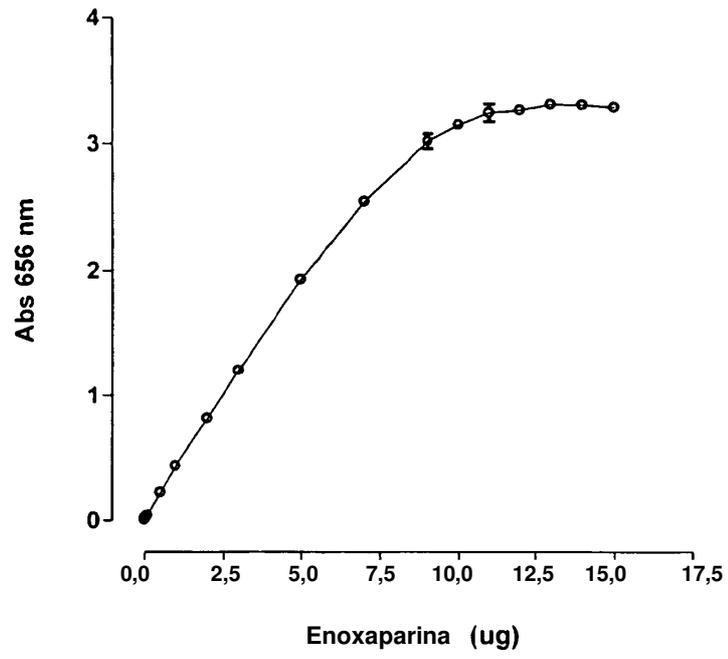


FIG. 4B

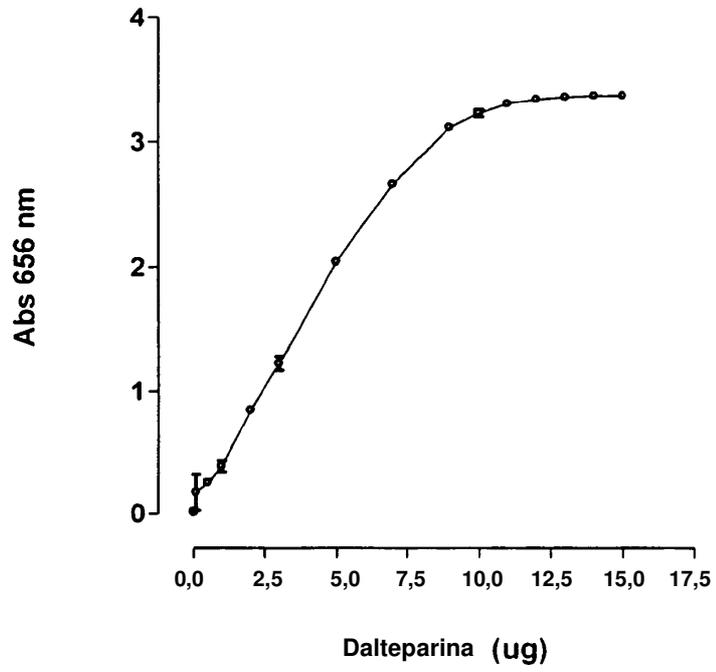


FIG. 5

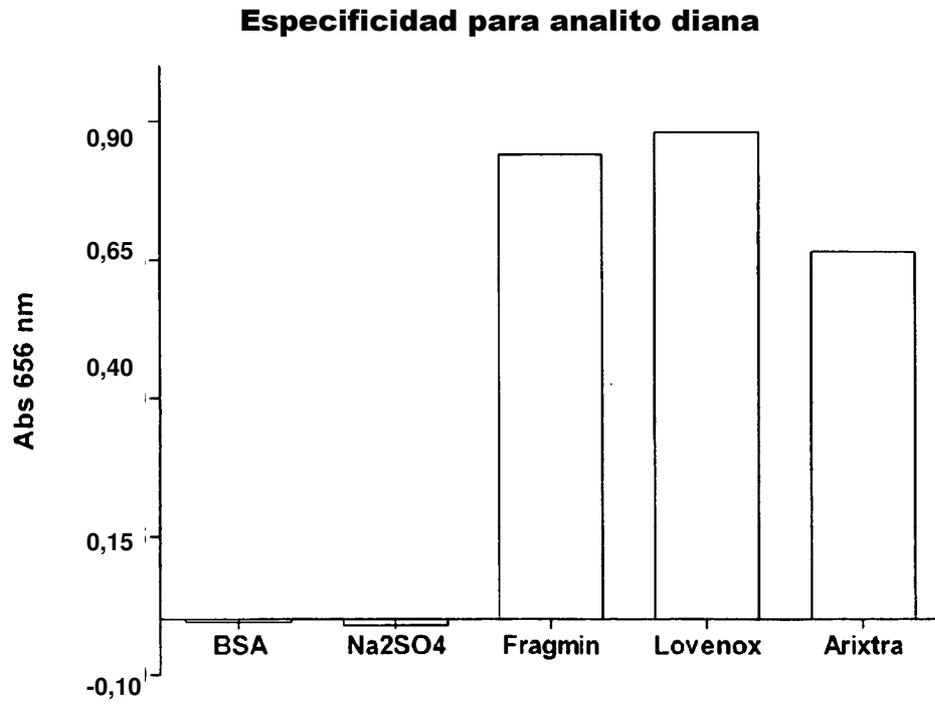
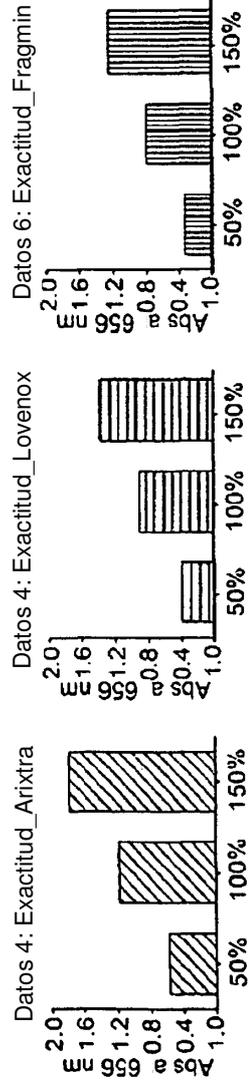


FIG. 6



Tipo	Abs a 656 nm (INPUT)	Abs media	Abs media corregida del blanco
50%	0.5808		
50%	0.8966		
50%	0.6035	0.5936	0.5787
100%	1.2011		
100%	1.2111		
100%	1.2021	1.2047	1.1898
150%	1.8111		
150%	1.7781		
150%	1.7714	1.7863	1.7714

Ratio 50%/100% (%) =	42.86
Ratio 150%/100% (%) =	155.31

Tipo	Abs a 656 nm (INPUT)	Abs media	Abs media corregida del blanco
50%	0.3833		
50%	0.4114		
50%	0.4089	0.3984	0.3882
100%	0.8666		
100%	0.8837		
100%	0.8794	0.8772	0.8670
150%	1.3111		
150%	1.33		
150%	1.317	1.3193	1.3091

Ratio 50%/100% (%) =	41.77
Ratio 150%/100% (%) =	150.99

Tipo	Abs a 656 nm (INPUT)	Abs media	Abs media corregida del blanco
50%	0.3756		
50%	0.3701		
50%	0.3709	0.3722	0.3425
100%	0.8319		
100%	0.8094	0.8289	0.7993
150%	1.256		
150%	1.277		
150%	1.28	1.2710	1.2413

Ratio 50%/100% (%) =	48.64
Ratio 150%/100% (%) =	148.89

FIG. 7

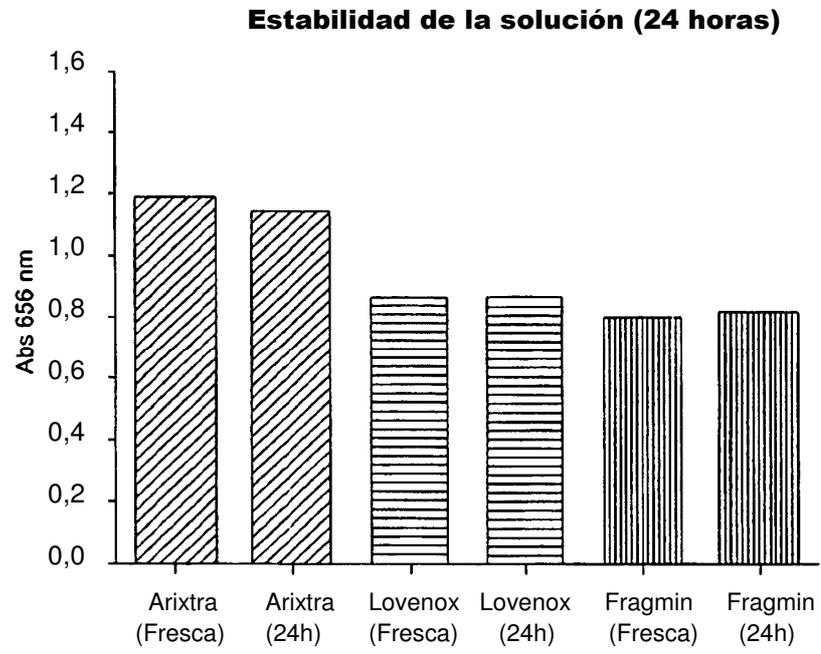


FIG. 8A

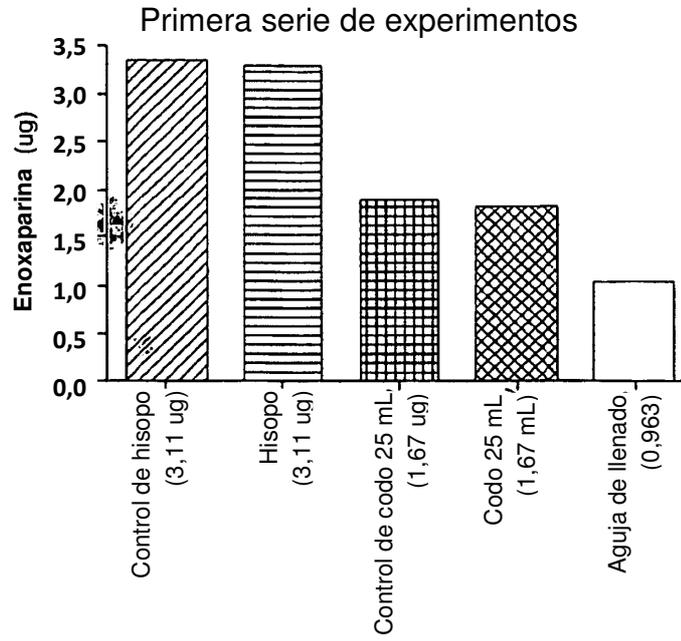


FIG. 8B

