

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 494**

21 Número de solicitud: 201231257

51 Int. Cl.:

**C08B 37/10** (2006.01)

**A61K 31/702** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**02.08.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.03.2014**

71 Solicitantes:

**LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ROVI, S.A.**

**(100.0%)**

**C/ Julian Camarillo, 35**

**28037 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**FRANCO RODRÍGUEZ, Guillermo y**

**GUTIERRO ADÚRIZ, Ibón**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

54 Título: **Procedimiento de obtención de heparinas de bajo y muy bajo peso molecular**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de heparinas de bajo y muy bajo peso molecular.

La presente invención se refiere al procedimiento de preparación de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y de muy bajo peso molecular (HMBPM) que comprende las etapas de transalifación de heparina en heparinato de benzalconio; despolimerización en medio orgánico y transalifación para formar una sal de un metal alcalino o alcalinotérreo. La presente invención también se refiere a un producto obtenido a través del procedimiento descrito en la presente invención.

**DESCRIPCION**

Procedimiento de obtención de heparinas de bajo y muy bajo peso molecular

**5 OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al procedimiento de preparación de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y de muy bajo peso molecular (HMBPM).

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La heparina es un polisacárido de la familia de los glicosaminoglicanos, formado por ácido urónico (ácido L-idurónico o D-glucurónico) y D- glucosamina, unidos de forma alternada. El ácido L-idurónico puede estar 2-O-sulfatado y la D-glucosamina, puede estar N-sulfatada y/o 6-O-sulfatada, y en menor extensión N-acetilada o 3-O-sulfatada (Mapping and quantification of the major oligosaccharides component of heparin. Linhardt RJ, Rice KG, Kim YS et al. *Biochem J* 1988; 254 :781-787). La heparina se usa preferentemente como sal sódica, pero también puede usarse como sal de otros metales alcalinos o alcalinotérreos y se utiliza principalmente como medicamento antitrombótico y anticoagulante (Anticoagulant therapy for major arterial and venous thromboembolism. Tran HAM, Ginsberg JS. *Basic principles and clinical practice*. Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ (Ed). Lippincott Williams and Wilkins; 2006:1673-1688).

Las heparinas se pueden clasificar en función de su peso molecular en, heparina no fraccionada (HNF), heparina de bajo peso molecular (HBPM) y heparina de muy bajo peso molecular (HMBPM). Las HBPM y HMBPM provienen de la despolimerización de la molécula original de HNF.

La acción antitrombótica de las HBPM, como ocurre en el resto de las heparinas, necesita la presencia de la antitrombina III (ATIII). La heparina se une a la antitrombina mediante una secuencia pentasacáridica específica, formando un complejo ternario HBPM-ATIII-Factor Xa. Se conoce a esta inhibición como acción antitrombótica. Por el contrario, en la acción anticoagulante, la neutralización de la trombina requiere la formación de un complejo ternario, HBPM-ATIII-Factor IIa, para lo que se necesitan al menos 18 sacáridos.

La mejora en las HBPM con respecto a la heparina sódica son debidas en gran medida al enriquecimiento en el sitio activante de la ATIII de las primeras con respecto a la segunda.

De otra parte, en la Heparina no fraccionada así como en las diversas HBPM ó HMBPM obtenidas por los métodos conocidos de despolimerización (enzimática, ácido nitroso,  $\beta$ -eliminación, etc.), existe una medida que nos permite la determinación de la cantidad de pentasacárido dentro de la estructura general a través de la cuantificación del contenido de una unidad disacáridica específica y exclusiva del pentasacárido, correspondiente a Ácido D-Glucurónico (G) enlazado a N-sulfo-3-O-sulfo-D-Glucosamina (ANS,3S). Esta medida nos permite obtener una buena correlación entre el porcentaje presente de éste disacárido y el contenido de pentasacárido en la estructura heparínica y por tanto de actividad anti-FXa de la heparina en cuestión (Low molecular weight heparins: structural differentiation by bidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. Guerrini M, Guglieri S, Naggi A, Sasisekharam R and Torri G. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2007; 33: 478-487).

En el estado de la técnica se han descrito varios métodos para la preparación de HBPM. En el documento patente EP01955436 se describe un proceso de obtención de HBPM mediante un procedimiento que comprende las etapas de transalifación de una sal de heparina en heparinato de bencetonio, esterificación del heparinato de bencetonio con cloruro de bencilo, purificación y obtención de la sal sódica del éster bencilico de la heparina, transalifación de la sal del éster bencilico de heparina en sal de bencetonio, despolimerización con una base fuerte en medio orgánico, saponificación del éster y, si es necesario, purificación del producto. En esta invención es necesaria la formación previa de un intermedio éster bencilico de heparina del que a su vez hay que generar su heparinato de amonio cuaternario correspondiente, que es el sustrato donde actúa la base. En la presente invención el procedimiento descrito es más simple, eliminando la necesidad de preparar el intermedio éster bencilico con el lógico ahorro tanto en costes como en tiempos en el proceso.

El documento patente EP1070503 describe un procedimiento para la obtención de heparinas de bajo peso molecular con las siguientes características peso molecular medio: 2000 – 4000 Daltons, actividad anti-FXa entre 100 y 150 UI/mg, actividad anti-FIIa menor o igual de 10 UI/mg. Estas HBPM se obtienen mediante tratamiento del heparinato de benzalconio con base en medio no acuoso, que consta de las siguientes etapas: transalifación de heparina sódica en heparinato de benzalconio, primera despolimerización con base en medio orgánico, transalifación de la sal de benzalconio en sal sódica, formación de la sal de benzalconio del intermedio obtenido tras la primera despolimerización, segunda despolimerización con base en medio orgánico, transalifación de la sal de benzalconio en sal sódica y purificación final.

Por último en el documento patente ES2003197 se describe el mismo procedimiento que en el documento patente EP1070503 antes comentado salvo que la sal que se forma es un heparinato de bencetonio. La base

que se utiliza en este procedimiento es el Triton B, hidróxido de amonio cuaternario y en el documento se describe que puede ser utilizada cualquier hidróxido de amonio cuaternario, no dando ninguna enseñanza de cómo puede influir la base en este procedimiento y explicando que no es un elemento decisivo al poderse utilizar cualquiera.

Por lo tanto por lo que se conoce en el estado de la técnica, se deriva que puede ser de un gran interés para la industria desarrollar un procedimiento eficiente alternativo para la preparación de HBPM y HMBPM que provea de un procedimiento que respete al máximo la secuencia pentasacáridica específica ATIII y que consiga eliminar etapas como la esterificación del heparinato de bencetonio con cloruro de bencilo, transalificación de la sal del éster bencilico de heparina en sal de bencetonio, y saponificación posterior de dicho éster.

### **DESCRIPCION DE LA INVENCION**

Los inventores han encontrado un nuevo procedimiento de obtención de HBPM y HMBPM de alto rendimiento y alta regioselectividad, lo que redundará en un proceso más selectivo. Además el procedimiento de la invención es más simple que otros procedimientos conocidos.

Los inventores han comprobado, que en los procesos de hemisíntesis de HBPM y HMBPM por mecanismos de  $\beta$ -eliminación la utilización específicamente como sustrato para la despolimerización de heparinato de benzalconio, confiere a la acción de bases fuertes y estéricamente impedidas la capacidad de preservar el pentasacárido activante de la ATIII, ya que este pentasacárido presenta en su estructura un monosacárido trisulfatado y por tanto estéricamente más impedido que otras posibles posiciones de rotura de la molécula que presentan monosacáridos con menor grado de sulfatación.

El procedimiento se caracteriza por una primera etapa de transalificación, es decir de una reacción de reconversión de una sal en otra sal, una despolimerización con una base fosfaceno o una base derivada de la guanidina y una última transalificación.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de las composiciones de la invención que comprenden las etapas de:

- a) transalificación de heparina de un metal alcalino o alcalinotérreo en heparinato de benzalconio,
- b) despolimerización en medio orgánico con la adición de una base fosfaceno o una base derivada de la guanidina; y
- c) transalificación para formar una sal de un metal alcalino o alcalinotérreo.

### **DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

Se complementa la presente memoria descriptiva, con un juego de figuras, ilustrativas del ejemplo preferente y nunca limitativo de la invención.

Figura 1: Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro 13C-1H HSQC del producto descrito en el ejemplo 4 despolimerizado con Triton B, registrado a 298 K en agua deuterada (D2O). En el espectro podemos observar cinco picos de correlación que corresponden a los cinco monosacáridos que componen el pentasacárido. ANSred, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; I2S, ácido L-idurónico 2-sulfato; ANS,3S, N-sulfo-3-O-sulfo-D-glucosamina; G-(ANS,3S), ácido D-glucurónico que precede a la unidad ANS,3S y ANS-(G), N-sulfo-D-glucosamina que precede al anillo de ácido D-glucurónico. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) se ha resaltado con un círculo porque es la señal más característica del pentasacárido y se va a tomar como referencia para cuantificar la presencia del mismo en diversas muestras.

Figura 2: Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro 13C-1H HSQC del producto descrito en el ejemplo 4 despolimerizado con BEMP, registrado a 298 K en agua deuterada (D2O). En el espectro podemos observar cinco picos de correlación que corresponden a los cinco monosacáridos que componen el pentasacárido. ANSred, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; I2S, ácido L-idurónico 2-sulfato; ANS,3S, N-sulfo-3-O-sulfo-D-glucosamina; G-(ANS,3S), ácido D-glucurónico que precede a la unidad ANS,3S y ANS-(G), N-sulfo-D-glucosamina que precede al anillo de ácido D-glucurónico. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) se ha resaltado con un círculo porque es la señal más característica del pentasacárido y se va a tomar como referencia para cuantificar la presencia del mismo en diversas muestras.

### **EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

En la presente invención, el término "base fosfaceno o una base derivada de la guanidina" se refiere a bases neutras fuertes y suavemente nucleófilas, como P1-t-Bu, P2-t-Bu, t-BuP4 y BEMP (2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3-diaza-2-fosforina) y TTMG (2-tert-butil-1,1,3,3-tetrametilguanidina) bases fuertes en solventes apróticos (MeCNpKa BEMP= 27.6, DMSOpKa t-BuP4H+= 32)

Como se mencionó arriba un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de las composiciones de HMBPM y/o HBPM que comprende las etapas de:

- a) transalificación de heparina de un metal alcalino o alcalinotérreo en heparinato de benzalconio;
- b) despolimerización en medio orgánico con la adición de una base fosfaceno o una base derivada de la guanidina;
- c) transalificación para formar una sal de un metal alcalino o alcalinotérreo.

En el caso de que el producto final se quiera purificar entre la etapa b) y la etapa c) se añade un peróxido orgánico y/o inorgánico.

Preferentemente la heparina de un metal alcalino o alcalinotérreo de la etapa a) es una heparina no fraccionada de un metal alcalino o alcalinotérreo.

Preferentemente el peróxido utilizado es peróxido de hidrógeno. Otros ejemplos de peróxidos orgánicos son: peróxido de metiletilcetona, peróxido de benzilo, peróxido de acetona. Ejemplos de peróxidos inorgánicos son compuestos que se caracterizan por la presencia del  $(O_2)^{-2}$  con metales de los grupos IA y IIA.

Preferentemente el producto obtenido tras la etapa c) se purifica. Preferentemente la purificación del producto se realiza por disolución del producto en agua a una concentración comprendida entre el 5 y 20 % (p/v), ajuste de pH entre un valor comprendido entre 6 y 7,5, adición de cloruro de sodio a una concentración comprendida entre el 3 y 15 % (p/v) y precipitación con alcohol. Preferentemente, el producto se disuelve en agua a una concentración comprendida entre el 7,5 y 12,5 % (p/v), ajuste de pH entre un valor comprendido entre el 6,5 y 7,25, adición de cloruro de sodio a una concentración comprendida entre el 5 y 10 % (p/v) y precipitación con metanol.

La etapa de despolimerización se realiza en un disolvente orgánico, preferentemente el disolvente orgánico es diclorometano, dicloroetano, cloroformo, dimetilformamida y/o formamida. Particularmente el disolvente orgánico es diclorometano, a una temperatura comprendida entre 20 y 40 °C.

La etapa b) de despolimerización, se realiza preferentemente en al menos dos adiciones sucesivas de la base. Particularmente se realiza tres adiciones sucesivas de la base.

La relación peso: volumen entre el heparinato de benzalconio y la base para cada adición, está entre 1:0,5 y 1:0,05, y preferentemente entre 1:0,3 y 1:0,1.

La relación peso: volumen entre el heparinato de benzalconio y el peróxido de hidrógeno está entre 1:1 y 1:0,01, y preferentemente entre 1:0,2 y 1:0,05.

Preferentemente la transalificación de la etapa c) se realiza por precipitación del medio de reacción sobre una disolución alcohólica de acetato de sodio, preferentemente sobre una disolución al 10 % (p/v) de acetato de sodio en metanol.

Un segundo aspecto de la presente invención es un producto obtenido mediante el procedimiento de la invención que contiene mayor fracción pentasacáridica y por tanto mayor actividad antitrombótica.

#### EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan a continuación sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

#### EJEMPLO 1

100 g de heparina sódica se disolvieron en 725 ml de agua y sobre ésta disolución se añadió una solución de 880 ml de cloruro de benzalconio al 50 % p/v en agua. El producto se filtró, se lavó con agua y se liofilizó. Se obtuvieron 233 g de heparinato de benzalconio.

10 g de heparinato de benzalconio obtenido en la etapa anterior, se disolvieron en 30 ml de diclorometano y se atempera a 35 °C. Sobre esta solución se adicionó 2-terc-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3-diaza-2-fosforina, BEMP, en tres porciones:

- 1,72 ml de BEMP. Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.
- 1,72 ml de BEMP. Se mantuvo la reacción 16h a 35 °C.
- 1,72 ml de BEMP. Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.

5 Sobre la disolución se añadió 1 ml de peróxido de hidrógeno y se mantuvo la reacción 16 h a 35 °C y posteriormente se precipitó sobre 60 ml de una solución de acetato sódico en metanol (10 % p/v). El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó con metanol. El producto obtenido se disolvió en 5 ml de agua, se neutralizó, se añadió cloruro sódico hasta una concentración del 10 % p/v y se precipitó con 125 ml de metanol. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con metanol y se secó en estufa de vacío a 35 °C. Se obtuvieron 3,39 g.

10 2 g del producto despolimerizado se disolvieron en 14,5 ml de agua y sobre la solución obtenida se añadió 17,6 ml de una solución de cloruro de benzalconio al 50% p/v en agua. El producto se filtró, se lavó con agua y se liofilizó. Los 4,84 g obtenidos se disolvieron en 14,5 ml de diclorometano y se atemperó a 35 °C. Se añadieron 0,83 ml de BEMP y se mantuvo la reacción 16h a 35 °C. Transcurrido ese tiempo se precipitó sobre 26 ml de una solución de acetato sódico en metanol (10 % p/v). El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó con metanol. El producto obtenido se disolvió en 5 ml de agua, se neutralizó, se añadió cloruro sódico hasta una concentración del 10 % p/v y se precipitó con 50 ml de metanol. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con metanol y se secó en estufa de vacío a 35 °C. Se obtuvieron 1,32 g (rendimiento 52,1 %). Las características del producto obtenido fueron las siguientes:

- Peso molecular medio: 2903 Da.
- Actividad anti-FXa: 193 UI/mg.
- 20 - Actividad anti-FIIa: 9,3 UI/mg.

#### EJEMPLO 2

25 50 g de heparina sódica se disuelven en 365 ml de agua y sobre ésta disolución se añade una solución de 221 g de cloruro de benzalconio al 50 % p/v en agua. El producto se filtra, se lava con agua y se liofiliza. Se obtienen 128,18 g de heparinato de benzalconio.

30 5 g de heparinato de benzalconio obtenido en la etapa anterior, se disuelven en 15 ml de diclorometano y se atempera a 35 °C. Sobre esta solución se adiciona BEMP en tres porciones:

- 0,86 ml de BEMP. Se mantiene la reacción 8h a 35 °C.
- 0,86 ml de BEMP. Se mantiene la reacción 16h a 35 °C.
- 0,86 ml de BEMP. Se mantiene la reacción 8h a 35 °C.

35 Sobre la disolución se añade 0,50 ml de peróxido de hidrógeno y se mantiene la reacción 16 h a 35 °C y posteriormente se precipita sobre 30 ml de una solución de acetato sódico en metanol (10 % p/v). El precipitado se recoge por centrifugación y se lava con metanol. El producto obtenido se disuelve en 2,5 ml de agua, se neutraliza, se añade cloruro sódico hasta una concentración del 10 % p/v y se precipita con 75 ml de metanol. El precipitado se recoge por filtración, se lava con metanol y se seca en estufa de vacío a 35 °C. Se obtienen 1,40 g.

45 1,40 g del producto despolimerizado se disuelven en 10 ml de agua y sobre la solución obtenida se añaden 6,18 g de una solución de cloruro de benzalconio al 50% p/v en agua. El producto se filtra, se lava con agua y se liofiliza. Se obtienen 3,40 g de heparinato de benzalconio que se disuelven en 10 ml de diclorometano y se atempera a 35 °C. Sobre esta solución se adiciona BEMP en tres porciones:

- 0,58 ml de BEMP. Se mantiene la reacción 8h a 35 °C.
- 0,58 ml de BEMP. Se mantiene la reacción 16h a 35 °C.
- 0,58 ml de BEMP. Se mantiene la reacción 8h a 35 °C.

50 Sobre la disolución se añade 0,34 ml de peróxido de hidrógeno y se mantiene la reacción 16 h a 35 °C y posteriormente se precipita sobre 20 ml de una solución de acetato sódico en metanol (10 % p/v). El precipitado se recoge por centrifugación y se lava con metanol. El producto obtenido se disuelve en 1,7 ml de agua, se neutraliza, se añade cloruro sódico hasta una concentración del 10 % p/v y se precipita con 50 ml de metanol. El precipitado se recoge por filtración, se lava con metanol y se seca en estufa de vacío a 35 °C. Se obtienen 0,85 g (rendimiento 43,6 %). Las características del producto obtenido son las siguientes:

- Peso molecular medio: 2.787 Da.
- Actividad anti-FXa: 121,5 UI/mg.
- 60 - Actividad anti-FIIa: 8,2 UI/mg.

#### EJEMPLO 3

65 0,50 g del producto obtenido en el ejemplo 2 se disuelven en 5 ml de agua, se neutraliza, se añade cloruro sódico hasta una concentración del 10 % p/v y se precipita con 6 ml de metanol. El precipitado se recoge por

filtración, se lava con metanol y se seca en estufa de vacío a 35 °C. Se obtienen 0,13 g. Las características del producto obtenido son las siguientes:

- 5 - Peso molecular medio: 3.534 Da.
- Actividad anti-FXa: 125,2 UI/mg.
- Actividad anti-FIIa: 19,4 UI/mg.

Se repiten los mismos pasos que en el párrafo anterior pero cambiando la base BEMP por TTMG

10 Las características del producto obtenido son las siguientes:

- Peso molecular medio: 3704 Da.
- Actividad anti-FXa: 118,5 UI/mg.
- Actividad anti-FIIa: 16,2 UI/mg.

15 EJEMPLO 4. Ejemplo comparativo

En este ejemplo se estudia el efecto del cambio de la base en el procedimiento de la invención. Se realizó el mismo ensayo con Triton B y con BEMP, para demostrar la influencia que tiene el uso de una base de fosfaceno en el procedimiento de la invención.

20 50 g de heparina sódica se disolvieron en de agua y sobre ésta disolución se añadió una solución de 221 g de cloruro de benzalconio al 50 % p/v en agua. El producto se filtró, se lavó con agua y se liofilizó. Se obtuvieron 128.18 g de heparinato de benzalconio.

25 25 g de heparinato de benzalconio obtenido en la etapa anterior, se disolvieron en 75ml de diclorometano y se atempera a 35 °C. Sobre esta solución se adicionó Triton B, en tres porciones:

- 30 - 6,25 ml de Triton B. Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.
- 6,25 ml de Triton B. Se mantuvo la reacción 16h a 35 °C.
- 6,25 ml de Triton B Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.

35 Sobre la disolución se añaden 2,5 ml de peróxido de hidrógeno y a continuación se purifica para obtener la sal sódica correspondiente. El producto obtenido se transalifica para obtener la sal de benzalconio, de acuerdo a las condiciones y proporciones descritas anteriormente.

40 15,68 g de heparinato de benzalconio obtenido en la etapa anterior, se disolvieron en 47ml de diclorometano y se atempera a 35 °C. Sobre esta solución se adicionó Triton B, en tres porciones:

- 3,92 ml de Triton B. Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.
- 3,92 ml de Triton B. Se mantuvo la reacción 16h a 35 °C.
- 3,92 ml de Triton B Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.

45 Se obtuvo un producto caracterizado por:

- Peso molecular medio: 2387 Da.
- Actividad anti-FXa: 94 UI/mg.

50 Se realizó el mismo ensayo pero utilizando en la despolimerización la base BEMP.

5 g de heparinato de benzalconio, se disolvieron en 15ml de diclorometano y se atempera a 35 °C. Sobre esta solución se adicionó BEMP, en tres porciones:

- 55 - 0,86 ml de BEMP. Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.
- 0,86 ml de BEMP. Se mantuvo la reacción 16h a 35 °C.
- 0,86 ml de BEMP. Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.

60 Sobre la disolución se añaden 0,5 ml de peróxido de hidrógeno y a continuación se purifica para obtener la sal sódica correspondiente. El producto obtenido se transalifica para obtener la sal de benzalconio, de acuerdo a las condiciones y proporciones descritas anteriormente.

3,40 g de heparinato de benzalconio obtenido en la etapa anterior, se disolvieron en 10ml de diclorometano y se atempera a 35 °C. Sobre esta solución se adicionó BEMP, en tres porciones:

- 65 - 0,58 ml de BEMP. Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.
- 0,58 ml de BEMP. Se mantuvo la reacción 16h a 35 °C.
- 0,58 ml de BEMP. Se mantuvo la reacción 8h a 35 °C.

Se obtuvo un producto caracterizado por:

- Peso molecular medio: 2787 Da.
- Actividad anti-FXa: 121,5 UI/mg.

5 En este ejemplo comparativo se puede ver como las bases de fosfaceno en el procedimiento aumentan de una forma muy significativa la actividad anti-FXa del producto obtenido.

10 El contenido promedio de monosacáridos en las muestras, se ha determinado mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), empleando experimentos bidimensionales <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) cuantitativos, según el método descrito por Marco Guerrini et al. El incremento de resolución que se consigue con la segunda dimensión permite cuantificar señales que solapan en el espectro monodimensional, siendo esta técnica de especial interés para estudiar carbohidratos complejos. Estas moléculas presentan graves problemas de solapamiento en los espectros monodimensionales de <sup>1</sup>H que dificultan la determinación de las áreas de picos aislados en el 1D para su cuantificación.

15 La cantidad de la unidad de ácido-D-glucurónico enlazado a N-sulfo-3-O-sulfo-D-glucosamina G-(ANS,3S) presente en GAGs obtenidos a partir de heparina natural, puede relacionarse directamente con la actividad anti-FXa de los mismos, tal y como describen M. Guerrini et al. Este disacárido pertenece al pentasacárido responsable de la interacción con la antitrombina III y sólo se detecta en las secuencias activas. La señal de correlación del carbono anomérico de este tipo de ácido glucurónico con el hidrógeno directamente unido aparece en una región característica y libre de solapamiento en el espectro HSQC y por ello puede emplearse para cuantificar la proporción del pentasacárido en la muestra.

20 Los espectros <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC del producto obtenido por despolimerización con Triton B y BEMP, se muestran respectivamente en las Figuras 1 y 2 adjuntas, en las que la señal de correlación <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C del protón anomérico correspondiente a la unidad de ácido glucurónico del pentasacárido se ha resaltado con un círculo.

25 La medida de la intensidad de esta señal en los espectros nos permite determinar la proporción de pentasacárido.

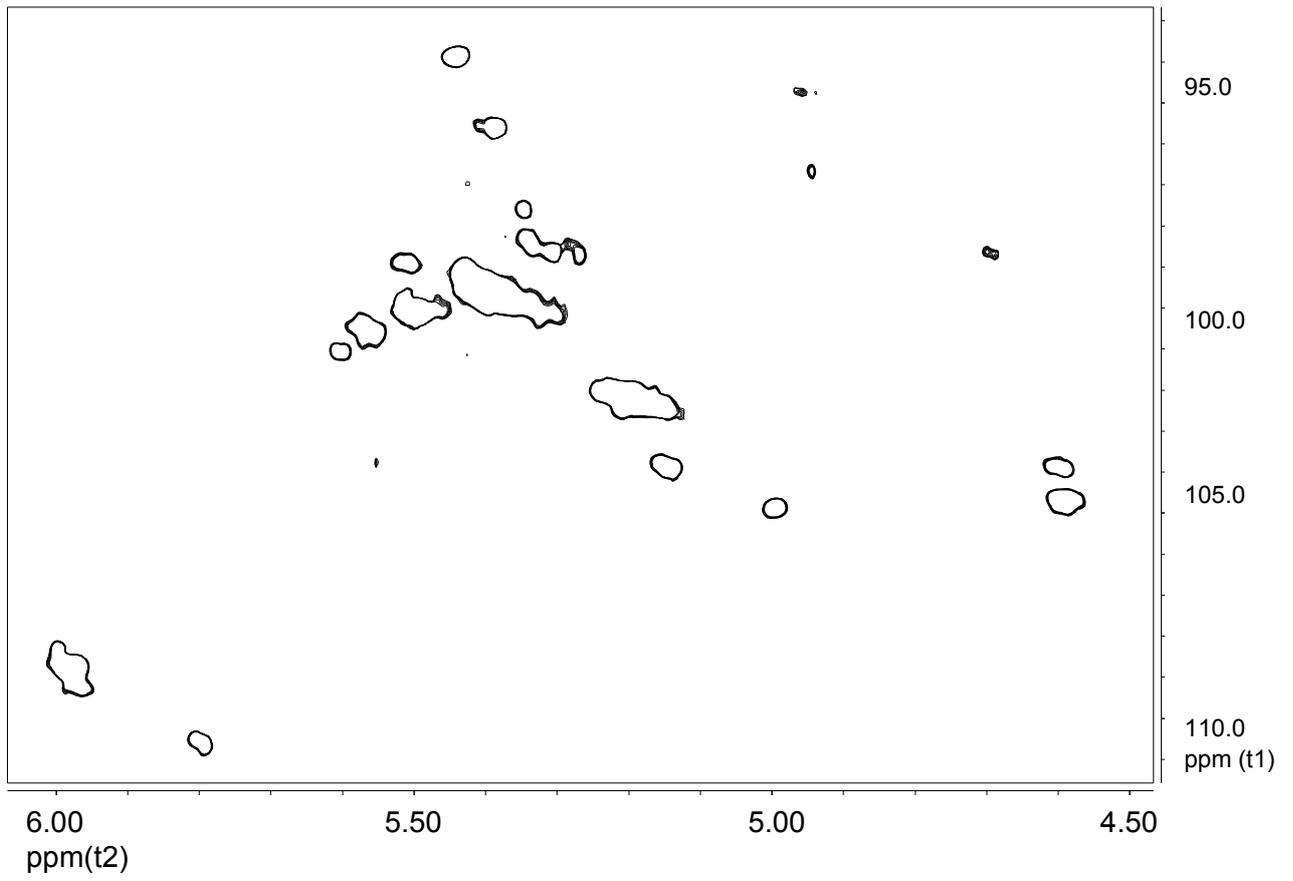
Tabla 1. Diferentes fracciones con Triton B y BEMP.

FRACCIONES	EJEMPLO DESPOLIMERIZACIÓN TRITON B, %	4. CON	EJEMPLO DESPOLIMERIZACIÓN BEMP, %	4. CON
ANS	37,0		37,1	
ANAc	2,5		1,8	
I2S	28,9		28,7	
I	1,4		2,3	
G	4,7		5,7	
ANS, 3S	1,4		2,7	
G-ANS 3S	1,6		2,0	

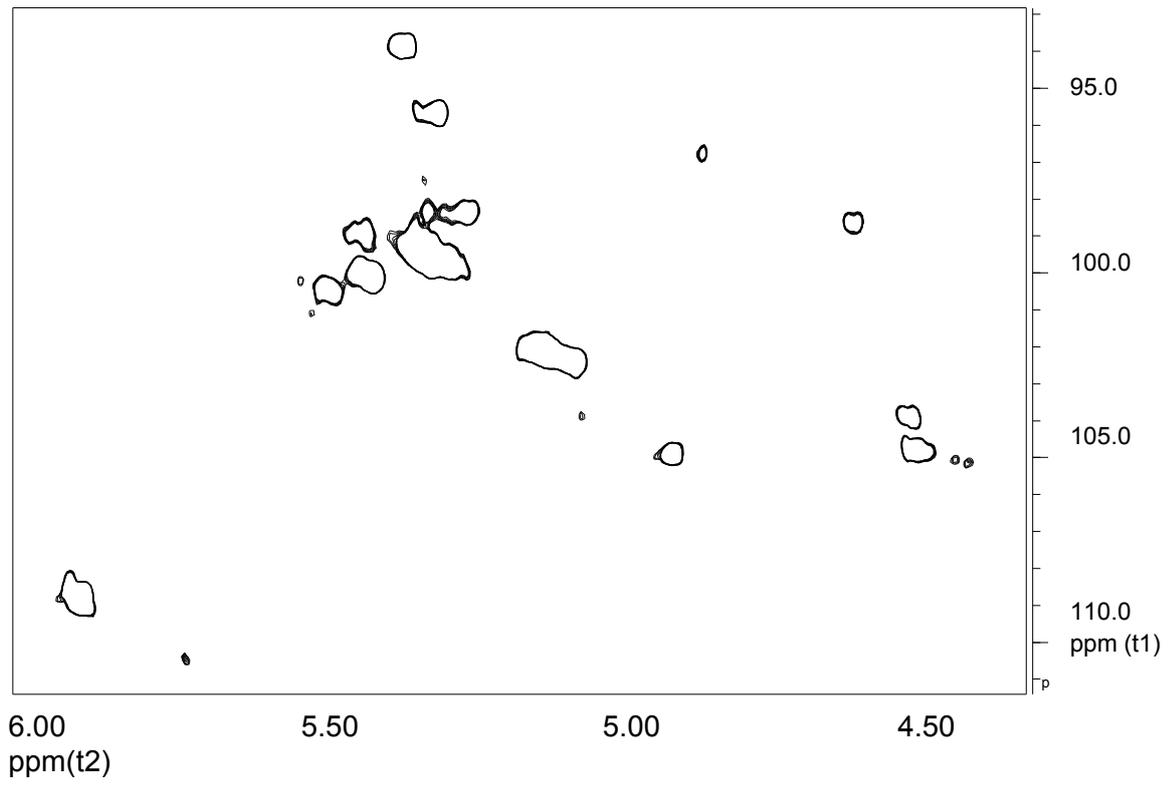
35 Como se puede comprobar la utilización de la base BEMP en lugar de Triton B, confiere una mayor selectividad en la reacción de despolimerización con una mayor preservación del pentasacárido activante de la ATIII, así el % de ANS,3S aumenta en casi un 93 % y el de % G-ANS,3S un 25 % en el producto despolimerizado con BEMP en relación al obtenido con Triton B, lo que garantiza que dicha fracción pentasacáridica se preserve claramente en los productos obtenidos mediante el procedimiento objeto de la invención proporcionando una actividad mejorada en dichos productos y asegurando el rendimiento del proceso objeto de la presente invención, gracias al aumento de la selectividad de la reacción.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de obtención de las composiciones de HMBPM y/o HBPM caracterizado porque comprende las etapas de:
- 5 a) transalificación de heparina de un metal alcalino o alcalinotérreo en heparinato de benzalconio;  
b) despolimerización en medio orgánico con la adición de una base fosfaceno o una base derivada de la guanidina; y  
c) transalificación para formar una sal de un metal alcalino o alcalinotérreo.
- 10 2. Procedimiento de obtención según reivindicación 1 caracterizado porque entre la etapa b) y la etapa c) se trata el producto obtenido en la etapa b) con peróxido de hidrógeno.
3. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 caracterizada porque el producto obtenido tras la etapa c) se purifica.
- 15 4. Procedimiento de obtención según reivindicación 3 caracterizada porque el producto obtenido tras la etapa c) se purifica mediante disolución en agua a una concentración comprendida entre el 7,5 y 12,5 % (p/v), ajuste de pH entre un valor comprendido entre el 6,5 y 7,25, adición de cloruro de sodio a una concentración comprendida entre el 5 y 10 % (p/v) y precipitación con metanol.
- 20 5. Procedimiento de obtención según reivindicación 1-4 caracterizado porque la etapa de despolimerización se realiza en diclorometano, a una temperatura comprendida entre 20°C y 40 °C.
- 25 6. Procedimiento de obtención según reivindicación 1 caracterizado porque en la etapa b) la relación peso: volumen entre el heparinato de benzalconio y la base para cada adición, está entre 1:0,5 y 1:0,05.
7. Procedimiento de obtención según reivindicación 1 caracterizado porque en la etapa b) la relación peso: volumen entre el heparinato de benzalconio y la base para cada adición, está entre 1:0,3 y 1:0,1.
- 30 8. Procedimiento de obtención según reivindicación 2 caracterizado porque en la etapa c) la relación peso: volumen entre el heparinato de benzalconio y el peróxido de hidrógeno está entre 1:1 y 1:0,01.
9. Procedimiento de obtención según reivindicación 2 caracterizado porque en la etapa c) la relación peso: volumen entre el heparinato de benzalconio y el peróxido de hidrógeno está entre 1:0,2 y 1:0,05.
- 35 10. Un producto obtenido a través del procedimiento de las reivindicaciones 1 a 9.



**FIG. 1**



**FIG. 2**



②① N.º solicitud: 201231257

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.08.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C08B37/10** (2006.01)  
**A61K31/702** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	VISKOV C et al. Description of the chemical and pharmacological characteristics of a new hemisynthetic ultra-low-molecular-weight heparin, AVE5026. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 20090701 Wiley Interscience, England 01.07.2009 VOL: 7 No: 7 Págs: 1143-1151 ISSN 1538-7836 Doi: doi:10.1111/J.1538-7836.2009.03447.X. Página 1143, columna derecha y página 1144, columna derecha.	1-10
A	ES 2003197 A6 (ROVI LAB FARMACEUT SA) 16.10.1988, página 2, columna 2, líneas 41-44,49-52,61-64; página 3, columna 3, líneas 60-61; reivindicación 1.	1-10
A	ES 2383597 T3 (AVENTIS PHARMA SA) 22.06.2012, página 3, líneas 45-47,49-53; página 4, líneas 4-7; página 5, líneas 8-17; página 6, líneas 1-5; página 6, línea 12 – página 7, línea 2.	1-10
A	ES 2347134 T3 (AVENTIS PHARMA SA) 26.10.2010, página 4, líneas 20-42,56.	1-10
A	US 5707973 A (BARON JEAN-PIERRE et al.) 13.01.1998, columna 1, líneas 9-12; columna 1, línea 66 – columna 2, línea 5; columna 3, líneas 29-46; columna 5, ejemplo 1.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
27.01.2014

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08B, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, NPL, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.01.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	VISKOV C et al. Description of the chemical and pharmacological characteristics of a new hemisynthetic ultra-low-molecular-weight heparin, AVE5026. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 20090701 Wiley Interscience, England 01.07.2009 VOL: 7 No: 7 Págs: 1143-1151 ISSN 1538-7836 Doi: doi:10.1111/J.1538-7836.2009.03447.X. Página 1143, columna derecha y página 1144, columna derecha.	01.07.2009
D02	ES 2003197 A6 (ROVI LAB FARMACEUT SA)	16.10.1988
D03	ES 2383597 T3 (AVENTIS PHARMA SA)	22.06.2012
D04	ES 2347134 T3 (AVENTIS PHARMA SA)	26.10.2010
D05	US 5707973 A (BARON JEAN-PIERRE et al.)	13.01.1998

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud hace referencia, tal y como ha sido presentada a un procedimiento de obtención de las composiciones de HMBPM y/o HBPM caracterizado porque comprende las etapas de: transalificación de heparina de un metal alcalino o alcalinotérreo en heparinato de benzalconio, despolimerización en medio orgánico con la adición de una base fosfaceno o una base derivada de la guanidina y transalificación para formar una sal de un metal alcalino o alcalinotérreo (reivindicación 1). El producto obtenido después de la despolimerización se trata con peróxido de hidrógeno (reivindicación 2). El producto obtenido tras la última transalificación se purifica (reivindicaciones 3 y 4). La etapa de despolimerización se realiza en diclorometano (reivindicación 5). En la etapa de despolimerización la relación peso: volumen entre el heparinato de benzalconio y la base para cada adición, está entre 1:0,5 y 1:0,05 (reivindicaciones 6 y 7). En la última etapa de trasalificación la relación peso: volumen entre el heparinato de benzalconio y el peróxido de hidrógeno está entre 1:1 y 1:0,01 (reivindicaciones 8 y 9). Y por último se reivindica el producto obtenido a través de dicho procedimiento (reivindicación 10).

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 y 8 DE LA LP.**

El documento D01 se refiere a heparinas de muy bajo peso molecular (ULMWH) denominadas AVE5026 que son el resultado de despolimerización quimioselectiva de la molécula de heparina mediante una base de fosfaceno como es BEMP. Las etapas del procedimiento de obtención son: transalificación de heparina de sodio con sales de bencetonio, esterificación de las sales de bencetonio de heparina con cloruro de bencilo, trasalificación del éster bencilico de heparina con sales de bencetonio, depolimerización del éster bencilico de heparina con BEMP, saponificación del éster de bencilo y por último purificación para obtener AVE5026 (véase página 1143, columna derecha y página 1144 columna derecha).

El documento D02 trata sobre un procedimiento de despolimerización de heparina para la obtención de una heparina de bajo peso molecular dotada de actividad antitrombótica que consiste en tratar una sal de amonio cuaternario en un disolvente no hidroxilado para obtener una heparina en forma de sal de sodio, de calcio o de magnesio (véase reivindicación 1). Los disolventes utilizados en la reacción de despolimerización son el diclorometano, la formamida, la dimetilformamida o cualquier otro disolvente que sea polar no hidroxilado (véase página 2, columna 2, líneas 41-44). Después de la reacción, se asilan los productos obtenidos de la precipitación, mediante una solución alcohólica de una sal alcalina o alcalinotérrica (véase página 2, columna 2, líneas 49-52), se lleva a cabo la precipitación con una solución de acetato sódico en metanol (véase página 3, columna 3, líneas 60-61). La heparina es una heparina de bajo peso molecular dotada de actividad antitrombótica, en la que no se degrada el lugar activo de la molécula (véase reivindicación 1 y página 2, columna 2, líneas 61-64).

El documento D03 describe mezclas de oligosacáridos preparadas por despolimerización de una sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina en medio orgánico, por medio de una base orgánica fuerte, preferentemente fosfacenos (véase página 3, líneas 45-47); transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencilico de la heparina despolimerizada en sal de sodio, saponificación de los ésteres residuales y opcionalmente purificación (véase página 3, líneas 49-53 y página 5, líneas 8-17). Dicha despolimerización permite despolimerizar la heparina conservando al máximo las secuencias afines a la ATIII (véase página 4, líneas 4-7). La despolimerización en sal de sodio se efectúa, generalmente, por tratamiento del medio de reacción con una disolución alcohólica de acetato de sodio, preferentemente, acetato de sodio en metanol (véase página 6, líneas 1-5). La etapa de purificación se lleva a cabo mediante peróxido de hidrógeno (véase página 6, línea 12- página 7, línea 2).

El documento D04 hace referencia a unas mezclas de polisacáridos derivados de heparina y a su procedimiento de obtención que pueden utilizarse como agentes antitrombóticos (véase página 4, línea 56). En dicho procedimiento se lleva a cabo la transalificación de una sal de heparina en heparinato de bencetonio (véase página 4, líneas 20-21), esterificación del heparinato de bencetonio con cloruro de bencilo (véase página 4, líneas 23-24), transalificación de la sal del éster bencilico de heparina en sal de bencetonio (véase página 5, líneas 26-27). La esterificación se efectúa en un disolvente orgánico tal como cloruro de metileno (véase página 4, líneas 39-40), y se lleva a cabo la precipitación mediante acetato de sodio en metanol (véase página 4, líneas 41-42).

El documento D05 divulga mezcla de oligosacáridos sulfatados que poseen excelentes propiedades antitrobóticas (véase columna 1, líneas 9-12; columna 1, línea 66-columna 2, línea 5). Dicha mezcla consiste en una fracción de la heparina, la cual es sometida a despolimerización (columna 3, líneas 29-46). Para ello, se añade una solución de cloruro de bencetonio a una de heparinato sódico, y se obtiene heparinato de bencetonio, que a su vez se disuelve en cloruro de metileno (diclorometano). La solución se calienta entre 25 y 35 grados centígrados durante 25 horas y se le añade una solución de acetato sódico en metanol (véase, columna 5, ejemplo 1).

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica, se puede decir que la presente solicitud de patente, tal y como ha sido presentada, posee novedad y actividad inventiva, ya que no se han encontrado documentos que divulguen el procedimiento de obtención de composiciones de HMBPM y/o HBPM que comprende las etapas de: trasalificación de heparina de un metal alcalino o alcalinotérreo en heparinato de benzalconio (se han encontrado documentos que utilizan sales de bencetonio, véase documentos D01, D04 y D05, pero no de benzalconio); despolimerización en medio orgánico con la adición de una base de fosfaceno (si se utiliza dicha base en los documentos D01 y D03) o una base derivada de la guanidina; y trasalificación para formar un sal de un metal alcalino o alcalinotérreo. Tampoco en los documentos citados, existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención contenida en las reivindicaciones 1-10. Por lo que las reivindicaciones 1-10 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.