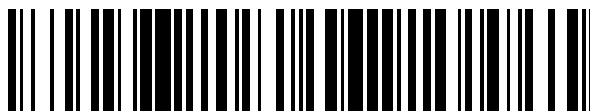


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 438**

51 Int. Cl.:

G01R 33/46 (2006.01)

G01N 24/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2013** **E 13722991 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2850447**

54 Título: **Procedimiento para decidir si una muestra es compatible con una norma de producción establecida para productos heterogéneos**

30 Prioridad:

17.05.2012 EP 12168422

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

17.06.2016

73 Titular/es:

**ISTITUTO DI RICERCHE CHIMICHE E
BIOCHIMICHE "G. RONZONI" (50.0%)**

Via G. Colombo 81

20133 Milano, IT y

ANGLO - ITALIAN CHEMOMETRICS LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

TORRI, GIANGIACOMO;

GUERRINI, MARCO y

RUDD, TIMOTHY ROBERT

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 574 438 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para decidir si una muestra es compatible con una norma de producción establecida para productos heterogéneos

5 [0001] Muchas áreas de la producción industrial, incluyendo la producción farmacéutica y la producción de alimentos, tienen que tratar con productos estructuralmente heterogéneos, que se consideran de todas maneras como un tipo de material. La propiedad de un material de tener una gama de estructuras (heterogeneidad) es un problema en la producción industrial debido a la dificultad de controlar la naturaleza exacta del material.

10 [0002] En una molécula esta heterogeneidad puede tomar varias formas: puede comprender un intervalo de pesos moleculares diferentes en el caso de un homopolímero (por ejemplo, celulosa), secuencia variada con la misma fórmula molecular, secuencia y peso molecular variados, así como, en cierto casos, diferentes grados o tipos de sustitución o ramificación.

15 [0003] Típicamente, la dispersión de estructuras sólo se puede controlar en general. Esto se realiza habitualmente mediante el uso de una o varias técnicas físicas, que deben ser sensibles a una o más de las propiedades variables. Estas técnicas miden el peso o tamaño molecular, e indican el promedio de esta propiedad para el material bajo examen.

20 [0004] Sin embargo, en muchos procesos industriales, la capacidad de controlar la composición con más detalle, por ejemplo para proporcionar información de la secuencia o los medios de establecimiento de criterios de aceptación para una determinada medida de control de calidad, sería muy deseable.

25 [0005] Un ejemplo típico de producto heterogéneo, en relación con la industria farmacéutica, es el agente anticoagulante ampliamente utilizado, heparina, que es un polisacárido lineal que comprende una mezcla de cadenas de polisacáridos con secuencias variadas y una dispersión de pesos moleculares. Además, dado que es un producto natural extraído de la mucosa de animales (en la actualidad) también se somete a variación debido al animal individual, la variación regional e incluso diferencias estacionales. Además, puede tener modificaciones estructurales adicionales, que se introducen durante los procedimientos de extracción y procesamiento. La heparina consiste en una unidad de uronato-glucosamina unida en 1,4: el residuo uronato es principalmente ácido α -L-idurónico (α -L-IdoA), pero también puede ser el epímero C-5 del ácido β -D-glucurónico (β -D-GlcA). El ácido urónico puede estar O-sulfatado en la posición 2, mientras que el residuo α -D-glucosamina (α -D-Glcn) puede estar O-sulfatado en las posiciones 6 y 3, siendo esta última más rara. Además, la glucosamina puede tener varias modificaciones en la posición 2, siendo N-sulfatada, N-acetilada o una amina libre. El disacárido más común es la estructura tri-sulfatada de ácido idurónico 2-O-sulfatado y glucosamina 6-O-sulfatada N-sulfatada.

35 [0006] Los productores y las autoridades reguladoras comparten un interés en saber más acerca de la composición de dichos materiales por varias razones. La primera es que proporcionaría los medios por los que se podría producir un producto mejor definido y reproducible en el sentido de ser más homogéneo. Esto también ayudaría a proporcionar una referencia a la que se podría comparar en cada ciclo de producción. En segundo lugar, se puede proporcionar al fabricante una información más detallada que puede vincular la estructura y la actividad. Éstas son de considerable importancia en el área de crecimiento de la producción biotecnológica, incluyendo compuestos/agentes biosimilares, y productos genéricos en la industria farmacéutica.

45 [0007] La consecución de estos objetivos es un reto considerable ya que se requiere comparar productos, cada uno de los cuales consiste en mezclas de materiales y cuyas composiciones no pueden definirse con precisión debido a las dificultades de la separación, identificación y/o cuantificación de los componentes.

50 [0008] Se han desarrollado varias técnicas analíticas con el fin de analizar moléculas heterogéneas, por ejemplo técnicas de análisis de RMN.

55 [0009] Un análisis de un producto heterogéneo se describe por ejemplo en el artículo de Rudd T.R. et al, "High sensitivity visualisation of contaminants in heparin samples by spectral filtering of 1H NMR spectra", Analyst, 2011, 136, pág. 1390-1398, en el que los espectros de RMN del producto a ensayar se comparan con una biblioteca de espectros de productos heterogéneos verificados.

60 [0010] Una es el análisis de componentes principales (PCA), que descompone una matriz de datos numéricos en una serie de características modelo que, cuando se recombinan reproducirán bastante bien el conjunto de datos original. Esto puede utilizarse para examinar cómo las diferentes muestras heterogéneas están relacionadas entre sí, pero carece de información sobre las características externas (no propias) que pueden estar presentes en una muestra cuando se compara con otra.

65 [0011] Otra es la espectroscopia de correlación bidimensional (2D-COS), que es un medio para dilucidar los cambios correlacionados y no correlacionados en sistemas químicos perturbados, esta perturbación puede ser mecánica o química. El análisis 2D-COS se puede realizar sobre datos generados por diferentes formas de espectroscopia;

puede realizarse sobre un solo conjunto de datos, como un sistema químico perturbado observado por una forma de espectroscopia (homocorrelaciones), o entre datos espectroscópicos generados por dos formas diferentes de espectroscopia para el mismo sistema y, a continuación, correlacionarse juntos (heterocorrelaciones).

5 [0012] Un desarrollo de 2D-COS es la filtración espectroscópica de correlación bidimensional (2D-COSf). En 2D-COSf el espectro de una muestra heterogénea se analiza frente a una biblioteca de espectros de productos heterogéneos verificados (Biblioteca 1). La biblioteca 1 se utiliza para "filtrar" el espectro de la muestra a analizar, eliminar características espectrales consistentes con la biblioteca de productos heterogéneos verificados y dejar solo características externas, si están presentes. Cualquier característica que permanece se considera que no es
10 consistente con la biblioteca 1 de compuestos heterogéneos verificados. Sin embargo, 2D-cosf no proporciona información sobre si las características externas extraídas aparecen a partir de variaciones debido a la heterogeneidad natural o a partir de señales no naturales. De hecho, dado que en un polímero heterogéneo no hay dos muestras idénticas, es concebible que, si se analiza una muestra de prueba heterogénea fiable utilizando 2D-COSf frente a una biblioteca que contiene muestras heterogéneas fiables, se pueden encontrar señales falsas. De
15 este modo, debe fijarse un criterio de aprobación o rechazo que maneje la variación natural dentro de las muestras heterogéneas.

[0013] Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento de análisis de muestras heterogéneas que sea de aplicación general y sea capaz de proporcionar una prueba objetiva para la evaluación de la conformidad de
20 muestras heterogéneas para establecer estándares de producción.

Breve descripción de la invención

25 [0014] La presente invención proporciona un procedimiento de análisis de productos heterogéneos, por ejemplo heparina, que puede definir si dicho producto heterogéneo es consistente con una biblioteca de muestras heterogéneas verificadas mediante el análisis de la variación, ya sea natural o externa, dentro de un conjunto de muestras heterogéneas. La invención se expone en las reivindicaciones 1 y 2, respectivamente. Las otras reivindicaciones definen realizaciones preferidas.

30 [0015] En 2D-COSf el espectro de un producto heterogéneo se filtra frente a una biblioteca de espectros de productos heterogéneos verificados (Biblioteca 1) y cualquier característica que no es consistente con la biblioteca 1 se considera como una característica externa.

35 [0016] El procedimiento de la presente invención es un nuevo desarrollo de 2D-COSf, que utiliza un segundo conjunto de espectros verificados (biblioteca 2) para determinar la variación aceptable del producto heterogéneo. Dicho procedimiento se define como "2D-COS-f comparativa", ya que compara una muestra de prueba filtrada con una biblioteca de muestras heterogéneas fiables filtradas.

40 [0017] En una realización, el procedimiento comprende obtener espectros complejos unidimensionales de un producto heterogéneo y aplicar 2D-COS-f comparativa. Los espectros/cromatogramas complejos unidimensionales son, por ejemplo, espectros ¹H-RMN, espectros de masas, espectros de infrarrojos, espectros Raman, cromatogramas producidas por cromatografía de líquido/gas, espectros de infrarrojo cercano y espectros UV. Si un producto heterogéneo analizado contra la biblioteca 1 tiene características que son mayores que las características encontradas analizando un espectro de la biblioteca 2 contra la biblioteca 1 se considera que las características no
45 son consistentes con las de la biblioteca 1.

[0018] En una segunda realización, el procedimiento comprende obtener espectros complejos unidimensionales de un producto heterogéneo y aplicar 2D-COS-f comparativa con muestreo aleatorio iterativo (2D-COS-firs). Los espectros/cromatogramas complejos unidimensionales son, por ejemplo, espectros ¹H-RMN, espectros de masas, espectros de infrarrojos, espectros Raman, cromatogramas producidas por cromatografía de líquido/gas, espectros de infrarrojo cercano y espectros UV. Cada componente se analiza contra los otros aleatoriamente, donde la proporción de biblioteca 1 se selecciona aleatoriamente y se utiliza un espectro seleccionado aleatoriamente de la biblioteca 2 en cada iteración, mientras que la muestra de prueba permanece constante. Esta realización proporciona una medida de la variación dentro de los espectros de productos verificados, con la que se puede
50 comparar la muestra de prueba. La iteración con el proceso de muestreo aleatorio proporciona una extracción más precisa y estable de características externas/no naturales.

[0019] En otra realización de la invención, la salida de datos de cualquiera de 2D-COS-f comparativa o 2D-COS-firs, se puede utilizar en pruebas estadísticas adicionales, por ejemplo, análisis de componentes principales, mínimos cuadrados parciales o máquinas de vectores de soporte, para identificar las características comunes/conocidas y
60 externas en la muestra de prueba.

[0020] Opcionalmente, el contenido de la biblioteca 1 y el contenido de la biblioteca 2 se pueden analizar usando el análisis de componentes principales con el fin de verificar que son consistentes entre sí.
65

[0021] En la presente memoria, espectro/espectros se definen como cualquier dato/conjunto de datos unidimensionales complejos.

[0022] A través de las diferentes realizaciones de la invención, es posible decidir si una muestra de prueba es consistente con una biblioteca de normas de producción de productos heterogéneos, para determinar los criterios de aceptación para ser considerada como una producción normal para productos heterogéneos y para detectar especies externas a las normas de producción de productos heterogéneos.

Descripción de las figuras

[0023] Figura 1: Espectro de ^1H RMN 1H de heparina de mucosa intestinal porcina, dentro de la región de 1,95 a 6,00 ppm, el pico de agua se ha cortado a $\sim 4,90\text{-}4,75$ ppm.

[0024] Figura 2: Análisis de componentes principales de una biblioteca de espectros de ^1H RMN de heparina fiable. Arriba a la izquierda: gráfico de sedimentación, la medición de la variación en el conjunto de datos. Arriba a la derecha, abajo a la derecha y a la izquierda: representaciones de carga secuencial de los componentes uno, dos y tres. Las cargas son la proporción de cada espectro "ideal" contenido dentro de un espectro real de muestra, tal como se determina por el análisis de componentes principales.

[0025] Figura 3: Análisis de componentes principales de una biblioteca de espectros de ^1H RMN de heparina fiable. Representaciones de puntuación para los componentes uno, dos y tres. Las características ideales extraídas por análisis de componentes principales.

[0026] Figura 4: Análisis de componentes principales de una biblioteca de espectros de ^1H RMN de heparina fiable. Análisis de agrupamiento jerárquico de la matriz de distancia de las cargas para los componentes uno, dos y tres.

[0027] Figura 5: Análisis de componentes principales de una biblioteca de espectros de ^1H RMN de heparina fiable. Análisis en red de la matriz de distancia de las cargas para los componentes uno, dos y tres.

[0028] Figura 6. Espectro de ^1H RMN de heparina de mucosa intestinal porcina (línea continua) y una heparina intestinal porcina adulterada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p) (línea de puntos), dentro de la región de 1,95 a 6,00 ppm, el pico de agua se ha cortado a $\sim 4,90\text{-}4,75$ ppm. Cabe indicar que los dos espectros son indistinguibles.

[0029] Figura 7. Análisis de componentes principales de una biblioteca de espectros de ^1H RMN de heparina intestinal porcina fiable que contiene una muestra adulterada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p). Arriba a la izquierda: gráfico de sedimentación, la medición de la variación en el conjunto de datos. Arriba a la derecha, abajo a la derecha y a la izquierda: representaciones de carga secuencial de los componentes uno, dos y tres. Las cargas son la proporción de cada espectro "ideal" contenido dentro de un espectro de un espectro, tal como se determina por el análisis de componentes principales. Cabe indicar que la muestra contaminada (círculos) no se distingue claramente de la heparina intestinal porcina fiable.

[0030] Figura 8. Análisis de componentes principales de espectros de ^1H RMN de heparina fiable que contiene una muestra adulterada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p). Representaciones de la puntuación para los componentes uno, dos y tres. Las características ideales extraídas por análisis de componentes principales.

[0031] Figura 9. Análisis 2D-COS-f de una muestra de heparina adulterada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p) analizada contra una biblioteca de heparina intestinal porcina fiable. A) matriz de covarianza de la biblioteca 1, la biblioteca de heparina intestinal porcina fiable. B) matriz de covarianza de la biblioteca 1 más la muestra de prueba adulterada. C) diferencia de B y A. La matriz en el panel C contiene las características que no son consistentes con las características espectrales contenidas en la biblioteca 1, es decir, las señales de heparina bovina externas.

[0032] Figura 10. La diagonal de la figura 9, panel C. El espectro de potencia contiene características de la heparina bovina externa (línea de puntos de correlaciones positivas [características por encima del eje x] y correlaciones negativas [características por debajo del eje x]). La diagonal es la varianza de la matriz de covarianza. La amplitud está normalizada al valor máximo de la matriz de covarianza de la biblioteca 1.

[0033] Figura 11. Análisis 2D-COS-f de una muestra de heparina de mucosa intestinal porcina adulterada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p) analizada contra una biblioteca de heparina intestinal porcina fiable (línea de color negro, correlaciones positivas [características por encima del eje x] y correlaciones negativas [características por debajo del eje x]). En este caso, así como la muestra de prueba que se analiza frente a la biblioteca 1, la definición de la muestra heterogénea, una heparina fiable no contenida dentro de biblioteca 1 también se analiza frente a la biblioteca (símbolo +). Este segundo ensayo ilustra la variación aceptable del producto heterogéneo en cuestión. Si la amplitud del espectro filtrado de la secuencia de prueba es mayor que ésta, se considera que contiene características externas o no consistentes.

[0034] Figura 12. Análisis 2D-COS-f de una muestra de heparina de mucosa intestinal porcina adulterada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p) analizada contra una biblioteca de heparina intestinal porcina fiable (símbolo +). En este caso, así como la muestra de prueba que se analiza frente a la biblioteca 1, la definición de la muestra heterogénea, un segundo conjunto de heparina fiable, biblioteca 2, no contenido dentro de la biblioteca 1, también se analiza frente a la biblioteca 1 (polígono negro). Esta segunda prueba ilustra la variación aceptable del producto heterogéneo en cuestión. Si la amplitud del espectro filtrado de la muestra de prueba es mayor que ésta, entonces se considera que contiene características externas o no consistentes. El polígono negro es el criterio de aprobación/rechazo para que la muestra que es una muestra heterogénea verificada. En este caso la línea de puntos negra es el módulo del intervalo de confianza del 95% ($|x \pm SE_x \times 1,96|$) para 1500 iteraciones de un muestreo aleatorio.

[0035] Figura 13. El efecto del tamaño de la biblioteca 1 en 2D-COS-firs. El tamaño de la biblioteca 1, que define el polímero heterogéneo, variaba de 10 a 57 espectros, con un tamaño de etapa de 1. En cada etapa se filtró una muestra de prueba (heparina contaminada con heparina de mucosa bovina o mucosa ovina al 1%) con 100 iteraciones, registrando el espectro promedio y la desviación estándar en cada punto a lo largo del espectro. A) Se representa la respuesta absoluta (área bajo el módulo del espectro de potencia) en cada etapa; círculos: espectro filtrado aleatoriamente de la biblioteca 2 (criterios de aprobación o rechazo); cuadrado negro: heparina contaminada con heparina de mucosa ovina al 1%; círculo negro: heparina contaminada con heparina bovina al 1%. B) La desviación estándar en un punto elegido aleatoriamente [3,03 ppm]. C) La respuesta absoluta (área bajo el módulo del espectro de potencia) representada frente al número de iteraciones para 2D-COS-firs de heparina de mucosa intestinal porcina contaminada con 5% (pequeña contaminación) [triángulo] y 20% (contaminación importante) de heparina de mucosa bovina [cuadrado]. D) La desviación estándar en un punto elegido aleatoriamente [3,03 ppm] para los espectros filtrados de heparina adulterado con de un 30% a un 1% de heparina bovina.

[0036] Figura 14. Análisis de componentes principales de una muestra de heparina de mucosa intestinal porcina que ha sido contaminada con heparina de la mucosa bovina al 1% (p/p) y con diez muestras de heparina de mucosa intestinal porcina. En este caso, todos los espectros de las muestras han sido filtrados por la biblioteca 1, la definición de heparina de mucosa intestinal porcina, esto elimina todas las señales de los espectros que son consistentes con las características contenidas en la biblioteca 1. En la figura 7 es difícil diferenciar una muestra de heparina contaminada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p), donde, como después de la filtración utilizando 2D-COS-firs, es posible diferenciar una muestra contaminada con un material de cantidad mucho menor.

[0037] Figura 15. 2D-COS-firs de una HBPM genérica, conteniendo ahora la biblioteca 1 HBPM Lovenox. Aquí se utiliza 2D-COS-firs para ilustrar las características en la HBPM genérica que no son comunes con las muestras de lovenox contenidas con la biblioteca 1. En el panel superior el resultado filtrado, en el panel inferior el espectro de la muestra de prueba y un espectro de ejemplo de lovenox.

Descripción detallada de la invención

[0038] La presente invención proporciona un procedimiento de análisis de productos heterogéneos capaz de definir si un producto heterogéneo, por ejemplo, un producto natural o biofabricado, es consistente con una biblioteca de muestras heterogéneas verificadas mediante el análisis de la variación, ya sea natural o externa, en un conjunto de muestras heterogéneas.

[0039] Preferiblemente, el producto heterogéneo es heparina, de peso molecular alto, bajo (PM de 3.000 a 7.000 Da, preferiblemente de 4.000 a 6.000 Da) y ultrabajo (PM de 1200 a 3.000 Da, preferiblemente de 1.600 a 2.400 Da). En otras realizaciones preferidas, el producto heterogéneo consiste habitualmente en cadenas de polímero que, a pesar de que contienen niveles consistentes de subunidades (o dentro de un rango), sin embargo se caracterizan por cadenas en las que la secuencia de estas subunidades es variable.

[0040] En una primera realización, se obtiene un espectro complejo unidimensional del producto a ensayar (muestra de prueba) y se prueba frente a una biblioteca de productos heterogéneos verificados (biblioteca 1) mediante el uso de 2D-COS-f comparativa tal como se describe a continuación. Los espectros/cromatogramas complejos unidimensionales son, por ejemplo, espectros $^1\text{H-RMN}$, espectros de masas, espectros de infrarrojos, espectros Raman, cromatogramas producidas por cromatografía de líquido/gas, espectros de infrarrojo cercano y espectros UV. Preferiblemente, el espectro complejo unidimensional es un espectro de $^1\text{H-RMN}$.

[0041] Antes de probar el producto heterogéneo frente a la biblioteca 1 mediante el uso de 2D-COS-f comparativa, se prueba una segunda biblioteca de productos verificados (biblioteca 2) frente a la biblioteca 1 mediante el uso de 2D-COS-f comparativa con el fin de determinar la variación aceptable dentro de la biblioteca 1. Tanto la biblioteca 1 como la biblioteca 2 comprenden muestras fiables del producto heterogéneo.

[0042] Una biblioteca 1 adecuada contiene más de 2 espectros, preferiblemente más de 50 espectros.

[0043] La biblioteca 1 contiene una serie de espectros mayor que el número de espectros de la biblioteca 2.

[0044] El contenido de la biblioteca 1, que define las características del producto heterogéneo, y el contenido de la biblioteca 2, que mide la variación aceptable del producto heterogéneo, cumplen con las normas requeridas. La consistencia de los miembros de la biblioteca 2 con la biblioteca 1 también se puede confirmar mediante una técnica estadística de exploración, tal como el análisis de componentes principales.

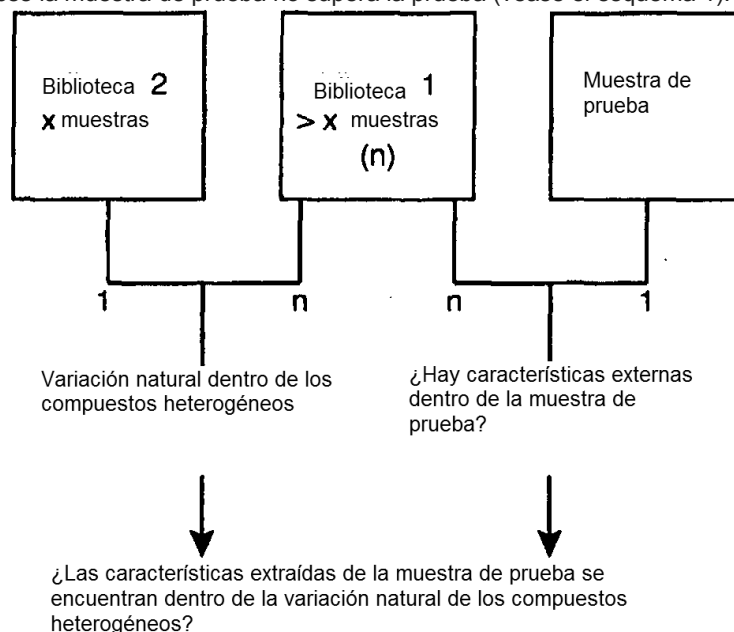
[0045] La biblioteca 1, ($X_{(biblioteca\ 1)}$) está centrada en la media restando los espectros promedio de la biblioteca 1 de cada uno de los espectros en la biblioteca 1 (i) y se obtiene un conjunto de datos x centrados en la media ($x = X_{(biblioteca\ 1)\ ij} - X_{(biblioteca\ 1)\ promedio\ i}$). A continuación se determina la matriz de covarianza de la biblioteca 1 centrada en la media (COV_{LIB}) (ii), donde COV_{LIB} es igual a la matriz de producto exterior de x , escalada al número de espectros n en el conjunto de datos ($COV_{LIB} = 1/(n-1) * xx^T$); las etapas (i) y (ii) se repiten a continuación sobre la biblioteca 1 más uno de los espectros de la biblioteca 2 y se obtiene la matriz de covarianza $COV_{LIBTEST}$ (iii); COV_{LIB} se resta de $COV_{LIBTEST}$ (iv) obteniendo la matriz de covarianza de diferencia $\Delta COV_{LIBTEST-LIB}$ ($COV_{LIBTEST} - COV_{LIB} = \Delta COV_{LIBTEST-LIB}$).

[0046] $\Delta COV_{LIBTEST-LIB}$ es una medición de la variación aceptable dentro de las muestras heterogéneas.

[0047] El mismo procedimiento ($iii-iv$) se repite uno por uno para todos los espectros que están dentro de la biblioteca 2 (v): los espectros de covarianza de diferencia forman el criterio de aceptación de si la muestra de prueba se ajusta a la biblioteca o no.

[0048] Las etapas (i) y (ii) se repiten a continuación sobre la biblioteca 1 más el espectro del producto heterogéneo a ensayar (muestra de prueba), obteniendo la matriz de covarianza COV_{TEST} (vi). COV_{LIB} se resta a continuación de COV_{TEST} (vii) formando la matriz de covarianza de diferencia $\Delta COV_{TEST-LIB}$ ($COV_{TEST} - COV_{LIB} = \Delta COV_{TEST-LIB}$) que revela las características de la muestra de prueba que no son consistentes con la biblioteca 1.

[0049] Se aplica el siguiente criterio de aprobación-rechazo en el análisis de la muestra de prueba: si la amplitud de cualquiera de las características dentro de $\Delta COV_{TEST-LIB}$ es mayor que cualquiera de las características dentro de $\Delta COV_{LIBTEST-LIB}$, entonces la muestra de prueba no supera la prueba (véase el esquema 1).



Esquema 1. Diagrama de flujo de 2D-COS-f comparativo con un criterio de aprobación o rechazo

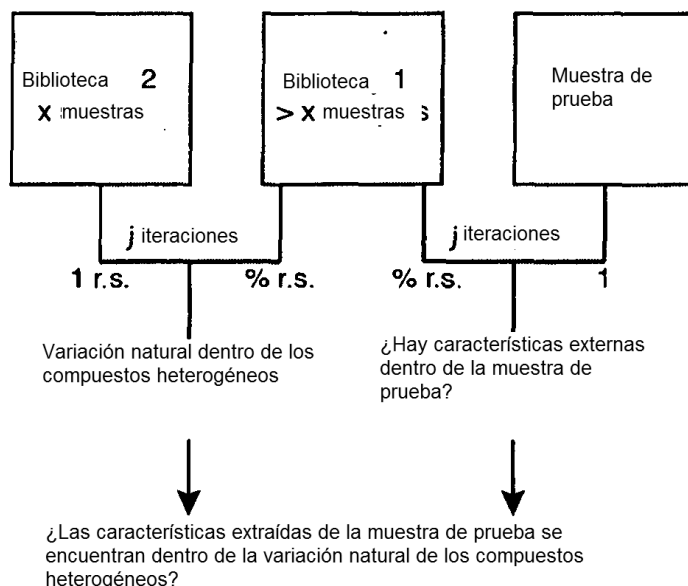
[0050] En una segunda realización se aplica una filtración de espectroscopia de correlación bidimensional con muestreo aleatorio iterativo (2D-COS-firs).

[0051] 2D-COS-firs proporciona una medición más exacta de la variación dentro de los espectros verificados (biblioteca 2 frente a biblioteca 1) y una extracción más precisa de características externas/no naturales del espectro de la muestra de prueba mediante el uso de una proporción seleccionada aleatoriamente de la biblioteca 1 con un espectro seleccionado aleatoriamente de la biblioteca 2 y la iteración del procedimiento, mientras la muestra de prueba permanece constante.

[0052] En esta segunda realización $\Delta COV_{TEST-LIB}$ se determina para una proporción seleccionada aleatoriamente de la biblioteca 1 y un espectro seleccionado aleatoriamente de la biblioteca 2 con las etapas (i-iv) descritas para la primera realización; estas etapas se repiten j veces hasta que la respuesta es estable, donde j es mayor que 10, preferiblemente j es de 10 a 8000, más preferiblemente de 1000 a 2000. La media se determina para los j espectros filtrados y se determina una medida de la variación en cada punto a lo largo de los espectros, por ejemplo, intervalo de confianza del 95% en cada punto (el valor medio en un punto \pm el error de la media en ese punto $\times 1,96$). Esto forma el criterio de aceptación de si el espectro de la prueba se ajusta a la biblioteca o no (véase el esquema 2).

[0053] La matriz de covarianza COV_{TEST} de la misma parte seleccionada aleatoriamente de la biblioteca 1 más el espectro de prueba y la $\Delta COV_{TEST-LIB}$ se determinan como en la primera realización (etapas vi y vii); estas etapas se repiten j veces hasta que la respuesta es estable, donde j es mayor que 10, preferiblemente j es de 10 a 8000, más preferiblemente de 1000 a 2000, determinando el espectro promedio de las j repeticiones.

[0054] Si la variación externa dentro de la muestra de prueba (es decir, la amplitud del espectro determinada probando el espectro de la muestra de prueba frente a la biblioteca 1) es mayor que la variación natural de la biblioteca medida en cada punto de los espectros (es decir, el intervalo de confianza del 95% en cada punto), entonces la muestra de prueba se considera que no es consistente con la definición de las muestras heterogéneas, biblioteca 1.



r.s. = muestras seleccionadas aleatoriamente

Esquema 2. Diagrama de flujo de 2D-COS-firs con un criterio de aprobación o rechazo

[0055] Para realizar el análisis de componentes principales los espectros están centrados en la media; se determina la matriz de covarianza del conjunto de espectros centrados en la media x ($c = xx^T$, donde c es igual a la matriz de productos cruzados de x); se realiza la descomposición/diagonalización Eigen de la matriz de covarianza, que forma un sistema de coordenadas ortonormal nuevo, los resultados de los cuales es $c = T\Lambda T^T$, donde Λ es una matriz diagonal de valores propios, mientras que T son los vectores propios (cargas). A continuación, el conjunto de datos x se proyecta sobre el nuevo sistema de coordenadas mediante la siguiente transformación $S=xT$, donde T son los vectores propios y S son las puntuaciones de los componentes.

[0056] En otra realización de la invención, la salida de datos de cualquiera de 2D-COS-f comparativa o 2D-COS-firs se puede utilizar en pruebas estadísticas adicionales, por ejemplo, análisis de componentes principales, mínimos cuadrados parciales o de máquinas de vectores de soporte, para identificar características comunes/conocidas y externas en la muestra de prueba.

Ejemplos

[0057] **Ejemplo comparativo 1: Análisis de Componentes Principales (PCA) del espectro de heparina intestinal porcina.** Se obtiene el espectro de RMN 1H de heparina de mucosa intestinal porcina. La heparina de

mucosa intestinal porcina es un carbohidrato heterogéneo, por lo tanto su espectro RMN ¹H contiene muchas bandas superpuestas (Figura 1). En la Figura 2 se diferencia una biblioteca de 57 heparinas de mucosa intestinal porcina farmacéuticas fiables. Estos 57 espectros pueden considerarse como una definición del polímero heterogéneo heparina. El análisis de componentes principales descompone los espectros en espectros ideales (componentes) que se pueden sumar de forma lineal para obtener cualquier espectro dentro del conjunto de datos de prueba. El gráfico de sedimentación de la Figura 2 indica la importancia de los componentes derivados: en este caso no hay un componente mayoritario. Los gráficos de carga de la Figura 2 ilustran cómo los espectros de prueba están compuestos de diferentes cantidades de los componentes de derivados de PCA. Las características espectrales de cada componente se muestran en las representaciones de puntuación (Figura 3).

[0058] Ejemplo comparativo 2: Procedimiento para detectar contaminantes de material de rumiante en heparina porcina. El análisis de componentes principales puede utilizarse para encontrar rarezas dentro de un conjunto de datos. La Figura 6 contiene los espectros de RMN ¹H de heparina de mucosa intestinal porcina farmacéutica fiable y una muestra de heparina contaminada con heparina de mucosa bovina al 10% (p/p). Visualmente es difícil diferenciar las dos (Figura 6). La Figura 7 y la Figura 8 contienen los resultados de PCA de los 57 espectros, que se consideran en este caso para constituir la definición de heparina de mucosa intestinal porcina farmacéutica, conteniendo la muestra de heparina contaminada que contiene heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p). Como puede observarse a partir de este análisis, la muestra contaminada no se diferencia claramente de la definición de heparina de mucosa intestinal porcina farmacéutica.

[0059] Ejemplo comparativo 3: Análisis 2D-COSf de una muestra de heparina adulterada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p). En lugar de tratar de descomponer todo el conjunto de datos, la muestra de prueba y las muestras de heparina de mucosa intestinal porcina farmacéutica fiable, en componentes, los 57 espectros de heparina, que se consideran que son un ejemplo de la definición de heparina de mucosa intestinal porcina farmacéutica, se pueden utilizar para "filtrar" la muestra de prueba eliminando características espectrales consistentes con la heparina de mucosa intestinal porcina farmacéutica, dejando sólo las características externas, cuando están presentes. La Figura 9 ilustra el proceso de 2D-COS-f: la figura 9A contiene la matriz de covarianza formada a partir de los 57 espectros de RMN ¹H, que comprenden una definición de ejemplo de heparina de mucosa intestinal porcina farmacéutica; este es un espectro pseudo-TOCSY donde las características que cambian juntas dentro del conjunto de datos están unidas entre sí. El espectro de la muestra de prueba se añade a los 57 espectros y se forma de nuevo la matriz de covarianza. Para filtrar las características de la heparina de mucosa intestinal porcina del espectro de prueba, se resta la matriz de covarianza representada en la Figura 9A de la matriz de covarianza representada en la figura 9B; esto deja la matriz de covarianza de diferencia (figura 9C) que contiene las características externas presentes en la muestra de prueba, es decir, las características debidas al contaminante de heparina bovina en este caso. La diagonal de la matriz de covarianza de diferencia (figura 9C) se muestra en la Figura 10: el espectro contiene características externas atribuidas a la heparina bovina, específicamente la región anómérica que es debido a la presencia de una mayor cantidad de des-6-O-sulfatación dentro de la heparina de mucosa bovina.

[0060] Ejemplo 1: Análisis de una muestra de heparina de mucosa intestinal porcina adulterada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p) mediante 2D-COSf comparativa. De acuerdo con la primera realización de la invención, se prueba (filtra) una muestra de prueba frente a la biblioteca 1 de heparina de mucosa intestinal porcina fiable, que define la muestra heterogénea. También se prueba (filtra) una heparina fiable, contenida en una segunda biblioteca (biblioteca 2) y no contenida dentro de la biblioteca 1, frente a la biblioteca 1. Esta segunda prueba ilustra la variación aceptable del producto heterogéneo en cuestión. El filtrado de la muestra de prueba por la biblioteca 1 se compara a continuación con la muestra de mucosa intestinal porcina fiable de la biblioteca 2, filtrada por la biblioteca 1 también. Si la amplitud del espectro filtrado de la muestra de prueba es mayor que la amplitud del espectro de filtrado de la heparina fiable filtrada de la biblioteca 2, se considera que contiene características externas o no consistentes con la heparina de mucosa intestinal porcina. En este ejemplo, la heparina de mucosa intestinal porcina contaminada con heparina de mucosa bovina al 10% (p/p) no pasó la prueba.

[0061] Ejemplo 2: Análisis de una muestra de heparina de mucosa intestinal porcina adulterada con heparina de mucosa intestinal bovina al 10% (p/p) mediante muestreo aleatorio iterativo (2D-COS-firs). De acuerdo con la segunda realización de la invención, se utiliza muestreo aleatorio para proporcionar un criterio de aprobación o rechazo más estricto. Este análisis requiere tres conjuntos de datos: una biblioteca de heparina de mucosa intestinal porcina fiable que se considera que es la definición de heparina de mucosa intestinal porcina (biblioteca 1, que contiene 57 espectros en este ejemplo), una biblioteca adicional de heparina de mucosa intestinal porcina fiable que es una biblioteca de prueba que determinará la variación natural dentro de la heparina de mucosa intestinal porcina (biblioteca 2, que contiene 12 espectros en este ejemplo) y, finalmente, la muestra de prueba. El criterio de aprobación o rechazo se halla mediante la filtración de una muestra seleccionada aleatoriamente de la biblioteca 2 mediante una selección aleatoria de la biblioteca 1 (el número de muestras contenidas dentro de la biblioteca 1 - 1), esto se repite 1500 veces y los espectros resultantes pueden promediarse para formar un espectro que abarcaba la variación natural promedio con heparina. Se determinó el intervalo de confianza del 95% ($\bar{x} \pm SE_{\bar{x}} \times 1,96$) y se utilizó como el criterio de aprobación o rechazo (Figura 12). A continuación, la muestra de prueba real pasó a través de un proceso similar, filtrándose mediante una selección aleatoria de la biblioteca 1 (el número de muestras contenidas dentro de la biblioteca 1-1), se itera esto 1500 veces: los resultados se promedian y se comparan con la medición de

la variación natural, el criterio de aprobación o rechazo. Si cualquiera de las señales se encuentra fuera de la medición de la variación natural, criterio de aprobación o rechazo, entonces se considera que es externo a la heparina de la mucosa intestinal porcina y que la muestra contiene material de heparina de mucosa intestinal no porcina. En el ejemplo que se muestra aquí la heparina de mucosa intestinal porcina contaminada con heparina de mucosa bovina al 10% (p/p) no pasa la prueba.

[0062] Ejemplo 3: El efecto del tamaño de la biblioteca 1 sobre el análisis de heparina contaminada con heparina de mucosa bovina o de mucosa ovina al 1% mediante 2D-COS-firs. El efecto de variar el tamaño de la biblioteca 1 y el número de iteraciones utilizadas para 2D-COS-firs se ilustra en la Figura 13. Cuando la muestra se itera 1500 veces, la desviación estándar en cualquier punto del espectro se vuelve estable y no se produce mejora si el número de iteraciones se incrementa más de 1500 veces (Figuras 13 C y D). Mientras que el uso de una biblioteca 1 que contiene 57 espectros proporciona un filtrado sensible, espectros adicionales agregados a la biblioteca 1 mejoraría el resultado (Figura 13 A y B.); para un resultado estable se requieren al menos 50 espectros.

[0063] Ejemplo 4: Análisis de Componentes Principales de una heparina de mucosa intestinal porcina contaminada con heparina de mucosa bovina al 1% después de 2D-COS-firs con 10 espectros de heparina de mucosa intestinal porcina fiable. En este ejemplo se aplica el análisis de componentes principales después de haber filtrado todos los espectros de muestras por la biblioteca 1, la definición de heparina de mucosa intestinal porcina, eliminando todos los signos de los espectros que son consistentes con las características contenidas en la biblioteca 1. Como puede observarse en la figura 14 la eliminación de todas las características que son consistentes con la biblioteca 1 mejora de manera importante la separación de los espectros con análisis de componentes principales. Mientras que en el ejemplo comparativo 2 era difícil diferenciar la heparina de mucosa intestinal porcina contaminada con heparina de mucosa bovina al 10% (p/p), aquí es posible diferenciar una muestra contaminada con un material de cantidad mucho menor. Por lo tanto, se puede utilizar 2D-COS-firs para mejorar la sensibilidad de otras técnicas estadísticas.

[0064] Ejemplo 5: Procedimiento para diferenciar las HBPM producidas por diferentes fabricantes. Aquí se utiliza 2D-COS-firs para filtrar una HBPM genérica frente a la biblioteca 1 que contiene espectros de HBPM Lovenox (Figura 15). Al filtrar la muestra de prueba de HBPM genérica frente a la biblioteca 1 que contiene Lovenox se revelan todas las funciones dentro de la HBPM genérica que no son consistentes con Lovenox.

Publicaciones:

[0065]

Noda, I. Two-dimensional infrared-spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 1989; 111 (21), 8116-8.

Noda, I. Generalized 2-dimensional correlation method applicable to infrared, Raman, and other types of spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 1993; 47(9), 1329-36.

Abdulla, H.A.N., et al. Using Two-Dimensional Correlations of ¹³C NMR and FTIR To Investigate Changes in the Chemical Composition of Dissolved Organic Matter along an Estuarine Transect. *Environmental science & technology*, 2010; 44(21), 8044-49.

Rudd T.R., et al. Site-specific interactions of copper(II) ions with heparin revealed with complementary (SRCD, NMR, FTIR and EPR) spectroscopic techniques. *Carbohydrate Research*, 2008; 343, 2184-2193.

Roden L, Ananth S, Campbell P, Curenton T, Ekborg G, Manzella S, Pillion D, Meezan E. Heparin - an introduction. In: Lane DA, Bjork, Lindahl U, eds. *AQ3. Heparin and Related Polysaccharides*. New York: Plenum Press, 1992; 1-20.

Lindahl U, Lidholt K, Spillmann D, Kjellén L. More to "heparin" than anticoagulation. *Thromb Res* 1994; 75:1-32.

Casu Bin Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulphate (Garg, H. G., Linhardt, R. J., and Hales, C. A., eds) 2005; pág. 1-28, Elsevier Ltd., Oxford, UK.

Yates EA, Santini F, Guerrini M, Naggi A, Torri G, Casu B. ¹H and ¹³C NMR spectral assignments of the major sequences of twelve systematically modified heparin derivatives. *Carbohydr Res*. 1996; 294, 15-27.

Bertini S, Bisio A, Torri G, Bensi B, Terbojevich M. Molecular Weight Determination of Heparin and Dermatan Sulfate by Size Exclusion Chromatography with a Triple Detector Array. *Biomacromolecules* 2005; 6, 168-173.

Casu B, Guerrini M, Naggi A et al. Characterization of sulfation patterns of beef and pig mucosal heparins by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1996; 46, 472-477.

- Warda M, Gouda EM, Toida T, Chi L, Linhardt RJ. Isolation and characterization of raw heparin from dromedary intestine: evaluation of a new source of pharmaceutical heparin. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2003; 136, 357-365.
- 5 Linhardt RJ, Gunay NS (1999) Production and chemical properties of low molecular weight heparins. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25, 5-16
- Mourier PAJ, Guichard OJ, Herman F, Viskov C, Heparin sodium compliance to the new proposed USP monograph: Elucidation of a minor structural modification responsible for a process dependent 2.10ppm. NMR signal, *J.Pharm.Biomed. Anal.* 2011; 54, 337-344.
- 10 Beni S, Limtiaco JF, Larive CK. Analysis and characterization of heparin impurities. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399; 527-539.
- 15 Beudet JM, Weyers A, Solakyildirim K, Yang B, Takieddin M, Mousa S, Zhang F, Linhardt RJ Impact of Autoclave Sterilization on the Activity and Structure of Formulated Heparin. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100, 3396-3404.
- Lee SE, Chess EK, Rabinow B, Ray GJ, Szabo CM, Melnick B, Miller RL, Nair LM, Moore EG. NMR of heparin API: investigation of unidentified signals in the USP-specified range of 2.12-3.00 ppm. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399, 651-662.
- 20 Xu Y, Masuko S, Takieddin M, Xu H, Liu R, Jing J, Mousa SA, Linhardt RJ, Liu J. Chemoenzymatic synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins. *Science.* 2011; 334, 498-501.
- 25 Winter W, Deubner R, Holzgrabe U. Multivariate analysis of nuclear magnetic resonance data-characterization of critical drug substance quality of gentamicin sulfate. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 38, 833-839.
- Beyer T, Diehl B, Randel G, Humpfer E, Schäfer H, Spraul M, Schollmayer C, Holzgrabe U. Quality assessment of unfractionated heparin using ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 48, 13-19.
- 30 Rudd TR, Gaudesi D, Skidmore MA, Ferro M, Guerrini M, Mulloy B, Torri G, Yates EA. Construction and use of a library of bona fide heparins employing ¹H NMR and multivariate analysis. *Analyst.* 2011; 136, 1380-1389.
- Ruiz-Calero V, Saurina J, Galceran MT, Hernández-Cassou S, Puignou L. Estimation of the composition of heparin mixtures from various origins using proton nuclear magnetic resonance and multivariate calibration methods. *Anal Bioanal Chem.* 2002; 373, 259-65.
- 35 Alban S, Lühn S, Schiemann S, Beyer T, Norwig J, Schilling C, Rädler O, Wolf B, Matz M, Baumann K, Holzgrabe U. Comparison of established and novel purity tests for the quality control of heparin by means of a set of 177 heparin samples. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399, 605-620.
- 40 Zang Q, Keire DA, Wood RD, Buhse LF, Moore CM, Nasr M, Al-Hakim A, Trehy ML, Welsh WJ. Determination of galactosamine impurities in heparin samples by multivariate regression analysis of their (¹H) NMR spectra. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399, 635-649.
- 45 Jolliffe IT, *Principal component analysis*, Springer, New York, London, 2002.
- Sasic S, Muszynskiand A, Ozaki Y, *Appl. Spectrosc.*, 2001; 55,343-349.
- 50 Noda I, Dowrey AE, Marcott C, Story GM, Ozaki Y, *Appl. Spectrosc.*, 2000, 54, 236A-248A.
- Rudd TR, Gaudesi D, Skidmore MA, Lima AM, Skidmore MA, Mulloy B, Torri G, Nader HB, Guerrini M, Yates EA. High-sensitivity visualisation of contaminants in heparin samples by spectral filtering of ¹H NMR spectra *Analyst.* 2011; 136, 1390-1398.
- 55

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de análisis de un producto heterogéneo que comprende:

- a) obtener un espectro complejo unidimensional del producto heterogéneo a ensayar (muestra de prueba),
- b) obtener una biblioteca de espectros de productos heterogéneos verificados (biblioteca 1),
- c) obtener una segunda biblioteca de espectros de productos heterogéneos verificados (biblioteca 2), en el que la biblioteca 2 contiene un número de espectros x y la biblioteca 1 contiene un número de espectros n , donde $n > x$ y n es más de 2, preferiblemente más de 50,
- d) comparar dicha biblioteca 1 con dicha biblioteca 2 mediante filtración espectroscópica de correlación bidimensional comparativa (2D-COS-f comparativa),
- e) comparar el espectro de la muestra de prueba con dicha biblioteca 1 mediante 2D-COS-f comparativa,
- f) identificar las características de dicho espectro de la muestra de prueba que no son consistentes con la biblioteca 1, en el que las etapas para realizar la 2D-COS-f comparativa comprenden:

- i. centrar en la media la biblioteca 1 ($X_{(\text{biblioteca } 1)}$) mediante la resta de los espectros promedio de la biblioteca 1 de cada uno de los espectros en la biblioteca 1, obteniendo el conjunto de datos x centrados en la media;

$$X = X_{(\text{biblioteca } 1) \text{ } ij} - X_{(\text{biblioteca } 1) \text{ } \text{promedio } i},$$

- ii. determinar la matriz de covarianza de la biblioteca 1 centrada en la media (COV_{LIB}), donde $\text{COV}_{\text{LIB}} = 1/(n-1) * xx^T$;

- iii. repetir las etapas *i-ii* con la biblioteca 1 más uno de los espectros de la biblioteca 2 y se obtiene la matriz de covarianza ($\text{COV}_{\text{LIBTEST}}$),

- iv. restar COV_{LIB} de $\text{COV}_{\text{LIBTEST}}$ obteniendo la matriz de covarianza de diferencia $\Delta\text{COV}_{\text{LIBTEST-LIB}}$,

- v. repetir las etapas *iii-iv* para cada uno de los espectros que se encuentran dentro de la biblioteca 2,

- vi. repetir las etapas *i-ii* con la biblioteca 1 más el espectro de la muestra de prueba y se obtiene la matriz de covarianza (COV_{TEST}),

- vii. restar COV_{LIB} de COV_{TEST} obteniendo la matriz de covarianza de diferencia $\Delta\text{COV}_{\text{TEST-LIB}}$, en el que la muestra de prueba se considera que no es consistente con la biblioteca 1 de productos heterogéneos verificados cuando tiene una o más características dentro de $\Delta\text{COV}_{\text{TEST-LIB}}$, cuya amplitud es mayor que cualquiera de las características dentro de $\Delta\text{COV}_{\text{LIBTEST-LIB}}$.

2. Procedimiento de análisis de un producto heterogéneo que comprende:

- a) obtener un espectro complejo unidimensional del producto heterogéneo a ensayar (muestra de prueba),
- b) obtener una biblioteca de espectros de productos heterogéneos verificados (biblioteca 1),
- c) obtener una segunda biblioteca de espectros de productos heterogéneos verificados (biblioteca 2), en el que la biblioteca 2 contiene un número de espectros x y la biblioteca 1 contiene un número de espectros n , donde $n > x$ y n es más de 2, preferiblemente más de 50,
- d) comparar dicha biblioteca 1 con dicha biblioteca 2 mediante filtración espectroscópica de correlación bidimensional comparativa con muestreo aleatorio iterativo (2D-COS-firs),
- e) comparar el espectro de la muestra de prueba con dicha biblioteca 1 mediante 2D-COS-firs comparativa,
- f) identificar las características de dicho espectro de la muestra de prueba que no son consistentes con la biblioteca 1, en el que las etapas para realizar la 2D-COS-firs comparativa comprenden:

- i. centrar en la media una proporción seleccionada aleatoriamente de la biblioteca 1 mediante la resta de los espectros promedio de dicha proporción seleccionada aleatoriamente de la biblioteca 1 de cada uno de los espectros en la biblioteca 1, obteniendo el conjunto de datos x centrados en la media;

- ii. determinar la matriz de covarianza de la proporción seleccionada aleatoriamente de la biblioteca 1 centrada en la media (COV_{LIB}), donde $\text{COV}_{\text{LIB}} = 1/(n-1) * xx^T$;

- iii. repetir las etapas *i-ii* con dicha proporción seleccionada aleatoriamente de la biblioteca 1 más un espectro seleccionado aleatoriamente de la biblioteca 2 y se obtiene la matriz de covarianza ($\text{COV}_{\text{LIBTEST}}$),

- iv. restar COV_{LIB} de $\text{COV}_{\text{LIBTEST}}$ obteniendo la matriz de covarianza de diferencia $\Delta\text{COV}_{\text{LIBTEST-LIB}}$,

- v. repetir las etapas *i-iv* un número j de veces, en el que j es de 10 a 10000, preferiblemente $j > 1000$;

- vi. repetir las etapas *i-ii* con dicha proporción seleccionada aleatoriamente de la biblioteca 1 más el espectro de la muestra de prueba y se obtiene la matriz de covarianza (COV_{TEST}),

- vii. restar COV_{LIB} de COV_{TEST} obteniendo la matriz de covarianza de diferencia $\Delta\text{COV}_{\text{TEST-LIB}}$,

- viii. repetir las etapas *vi-vii* de 2D-COS-firs comparativa un número j de veces, en el que j es de 10 a 10000, preferiblemente $j > 1000$;

que comprende además determinar el espectro promedio de las j repeticiones;

determinar una medición de la variación de la biblioteca 1 en cada uno de los puntos de los espectros, preferiblemente el intervalo de confianza del 95% en cada punto;

y en el que la muestra de prueba se considera no consistente con la biblioteca 1 de productos heterogéneos verificados cuando la amplitud de cualquiera de las características dentro de $\Delta\text{COV}_{\text{TEST-LIB}}$ es mayor que la medición de la variación de la biblioteca 1 en cada uno de los puntos de los espectros.

3. Procedimiento, según las reivindicaciones 1-2, que comprende además

verificar la consistencia de la biblioteca 1 y la biblioteca 2 mediante análisis de componentes principales.

4. Procedimiento, según las reivindicaciones 1-3, en el que el espectro complejo unidimensional del producto heterogéneo a ensayar se obtiene mediante ^1H RMN.
5. Procedimiento, según las reivindicaciones 1-4, en el que el producto heterogéneo es heparina, de peso molecular alto, bajo o ultrabajo, o derivados de heparina, en el que el peso molecular bajo está comprendido de 3.000 a 7.000 Da, preferiblemente de 4.000 a 6.000 Da, y el peso molecular ultrabajo está comprendido de 1.200 a 3.000 Da, preferiblemente de 1.600 a 2.400 Da.
- 10 6. Procedimiento, según las reivindicaciones 1-5, en el que la salida de datos de cualquiera de 2D-COS-f comparativa o 2D-COS-firs comparativa se utiliza adicionalmente en al menos una prueba estadística.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la prueba estadística es al menos una seleccionada del grupo que contiene análisis de componentes principales, mínimos cuadrados parciales, máquinas de vectores de soporte.

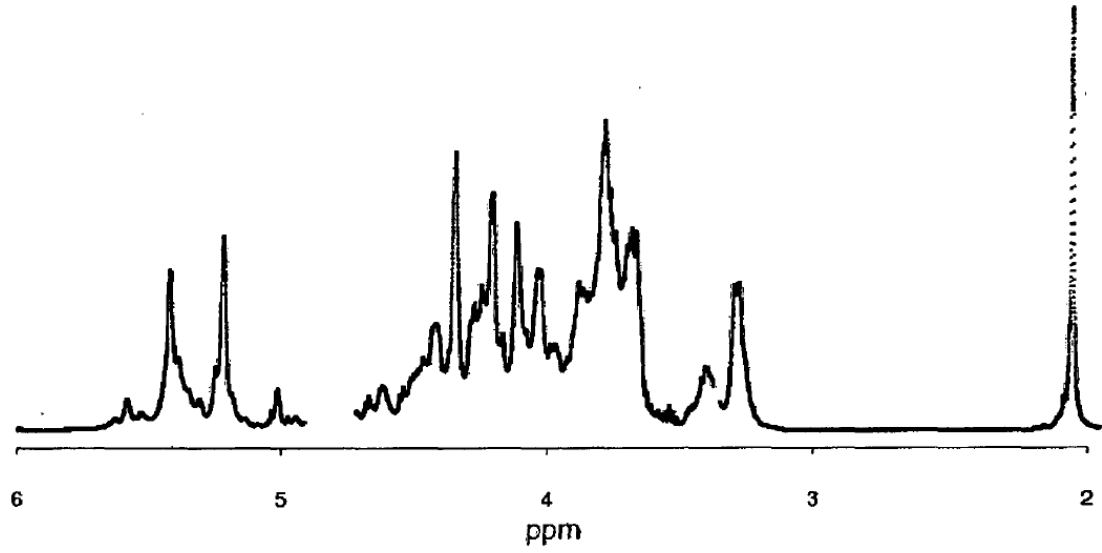


Figura 1

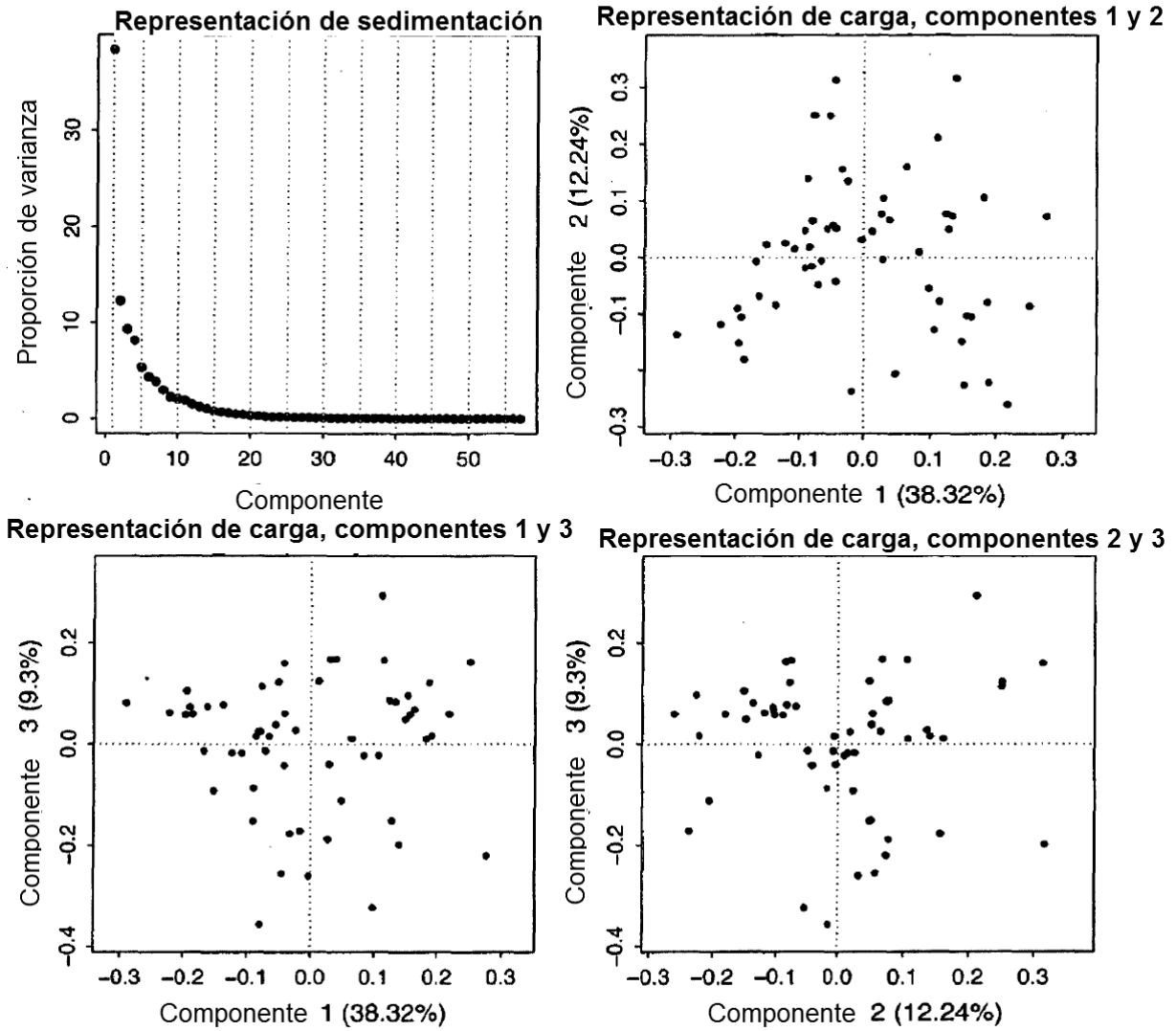


Figura 2

Representaciones de sedimentación,
componentes 1, 2 y 3

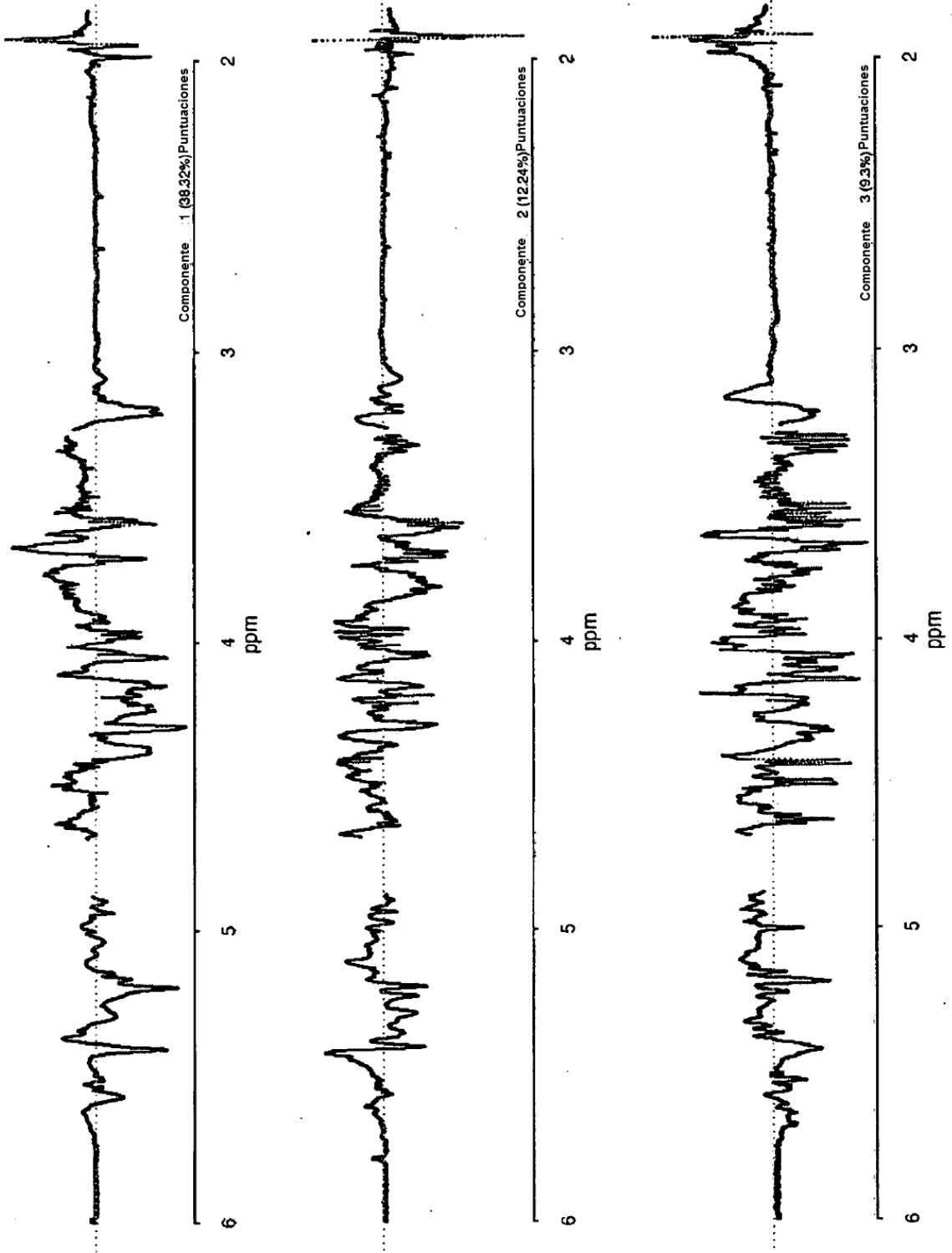


Figura 3

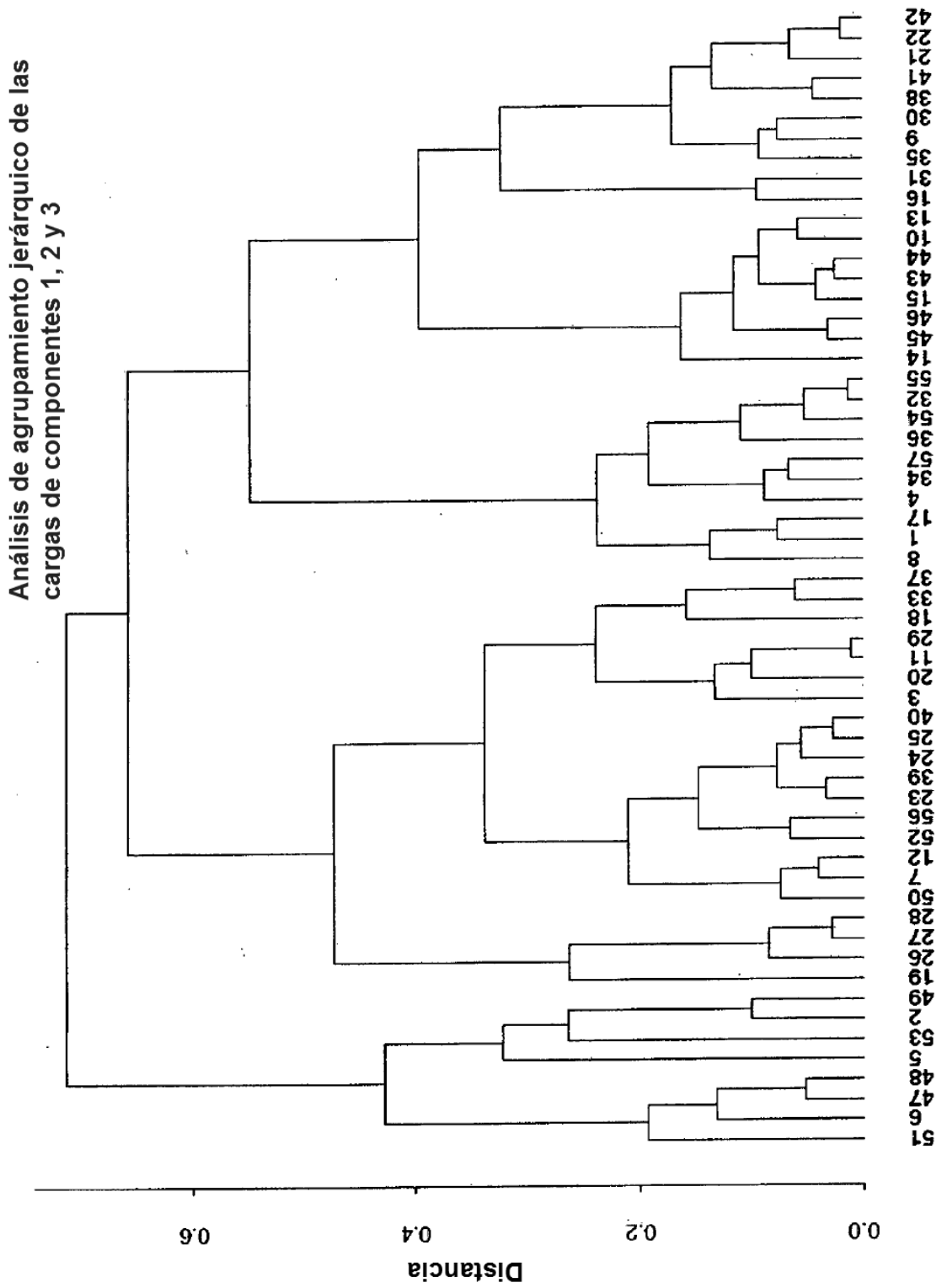


Figura 4

Análisis en red de las cargas de los componentes 1, 2 y 3

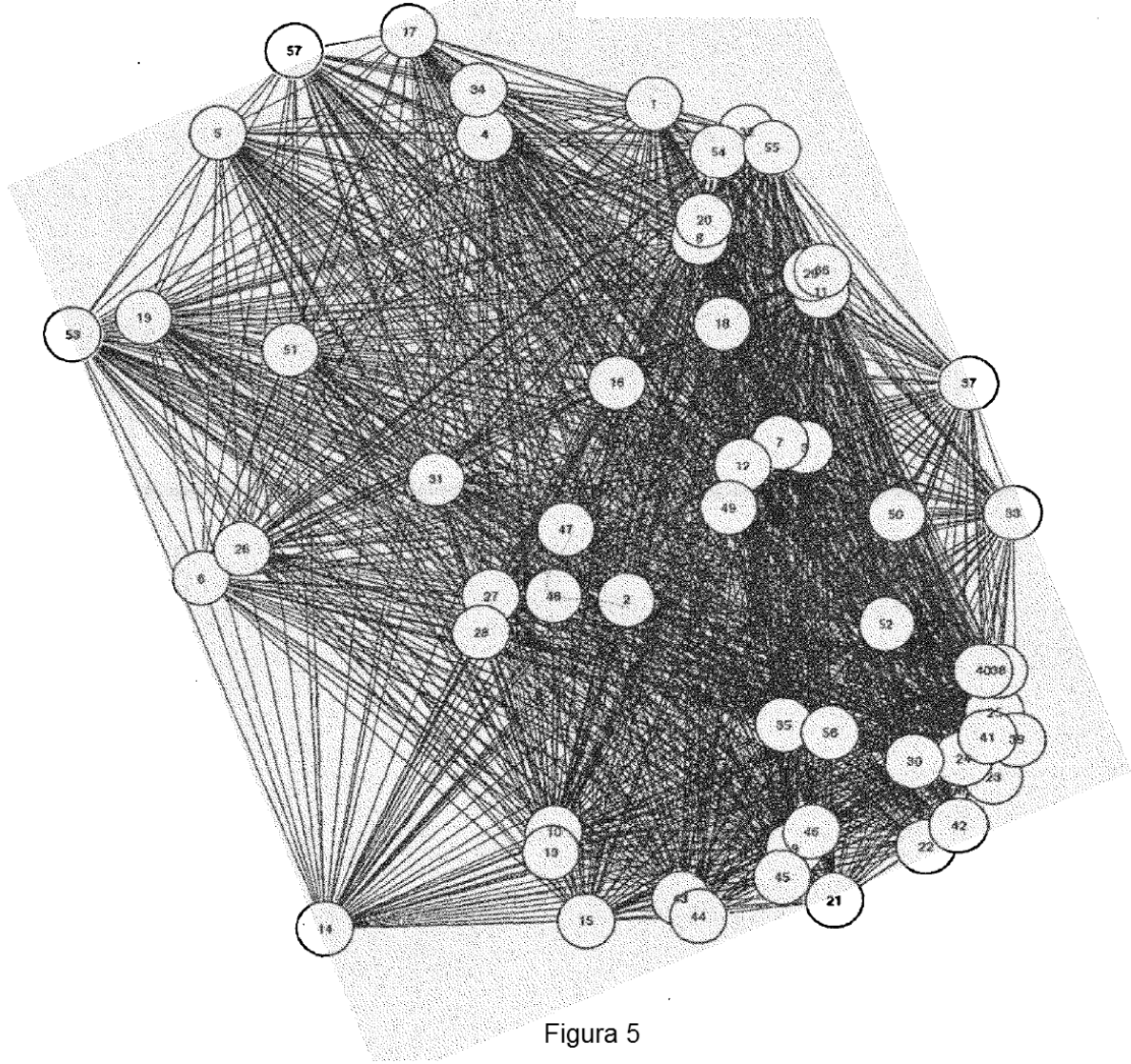


Figura 5

Heparina porcina [línea continua]

Heparina porcina adulterada con heparina bovina al 10% [línea discontinua]

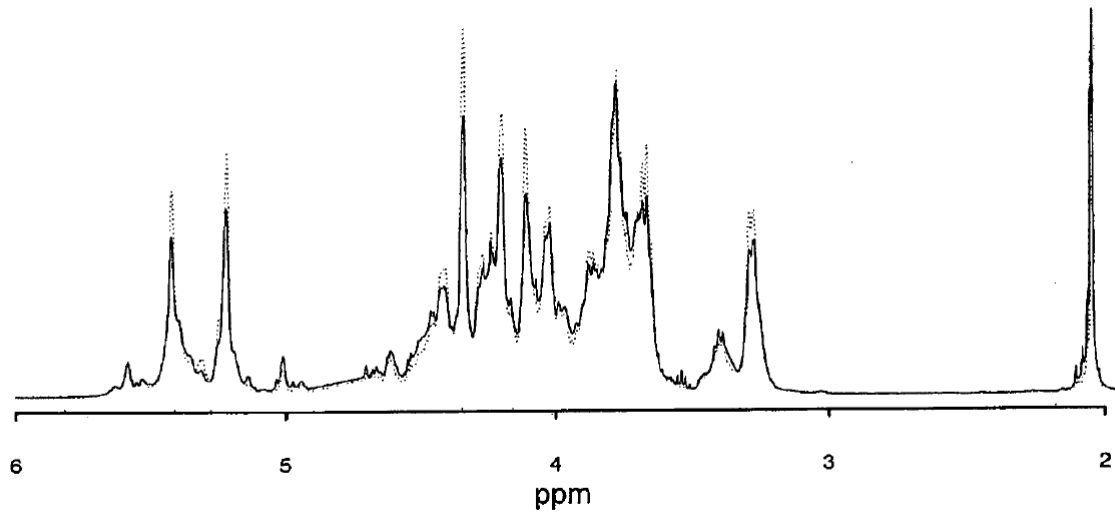


Figura 6

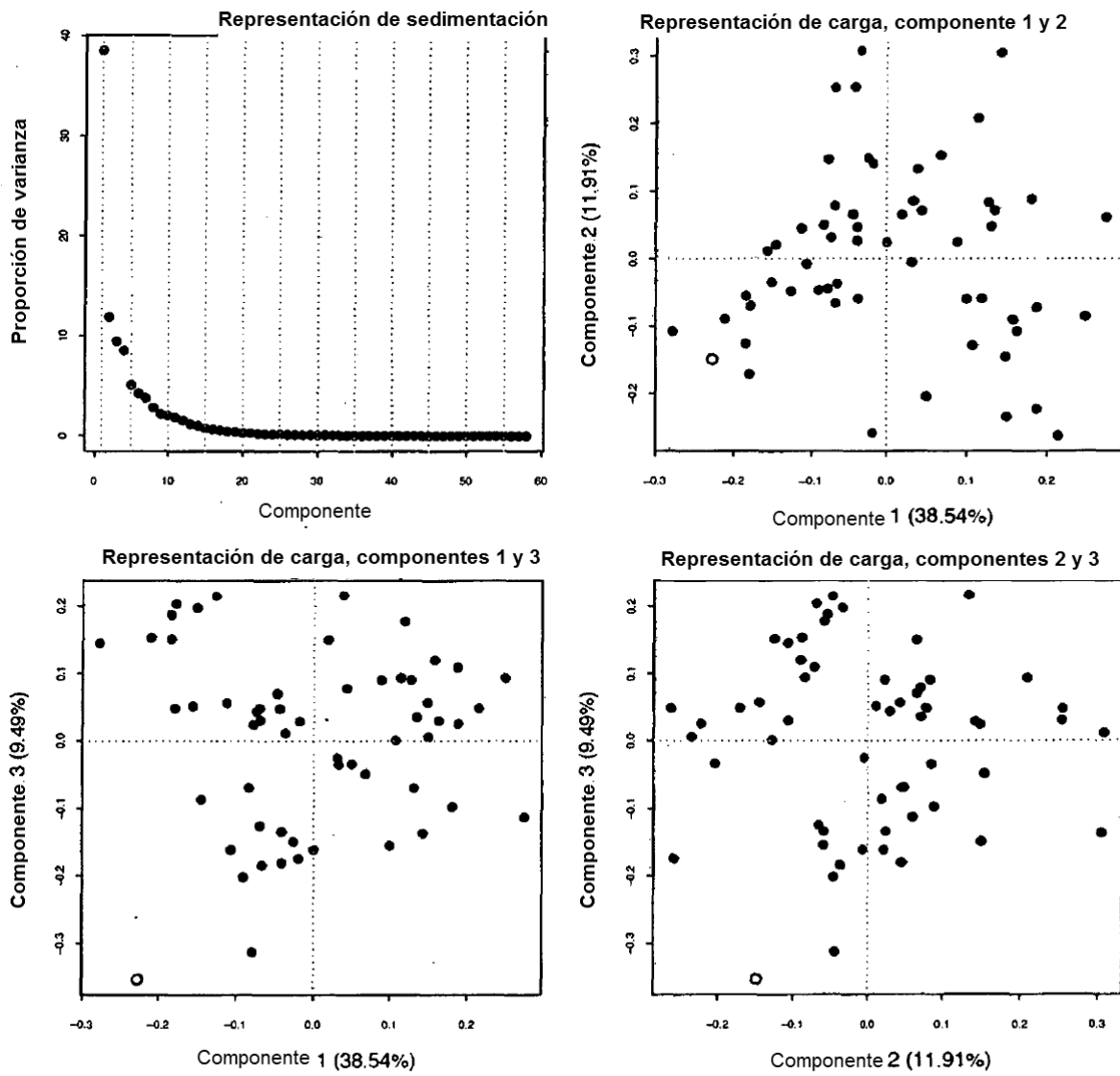


Figura 7

Representaciones de puntuación, componentes 1, 2 y 3

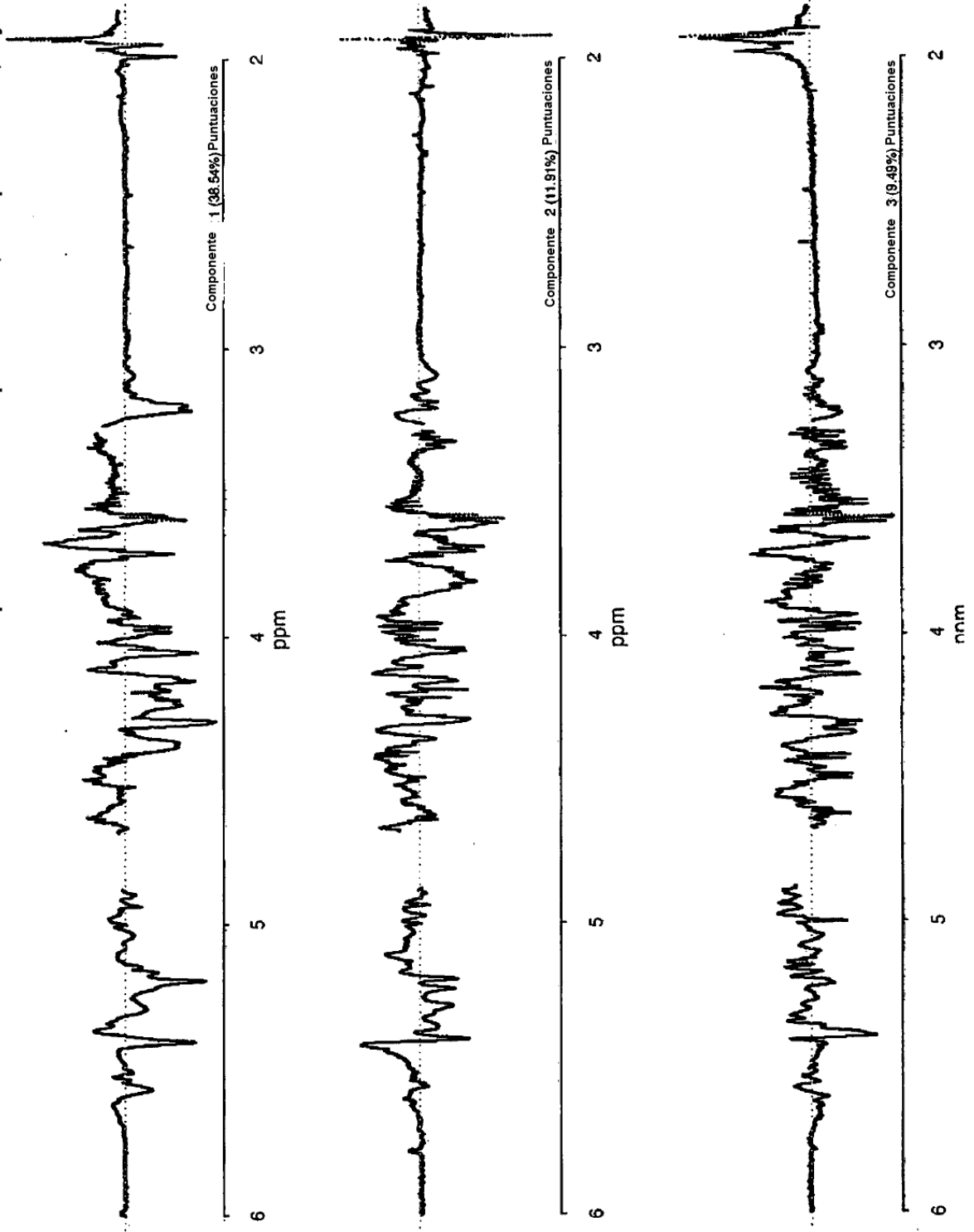


Figura 8

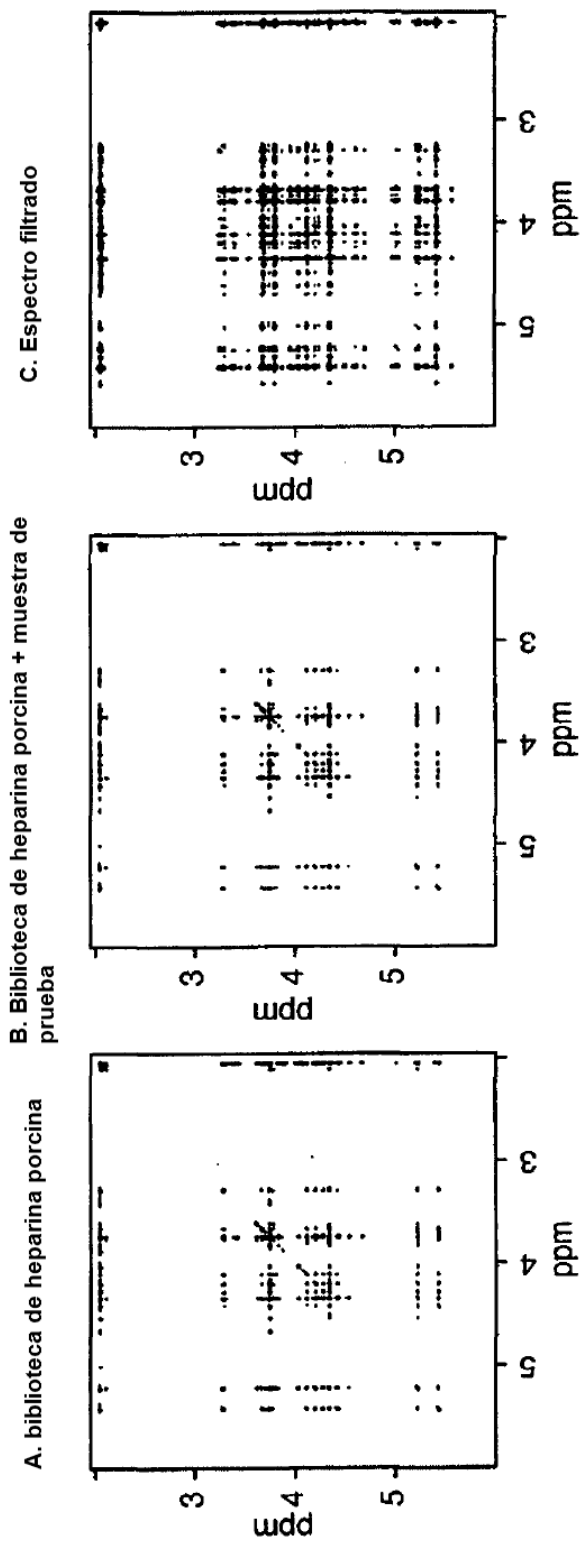


Figura 9

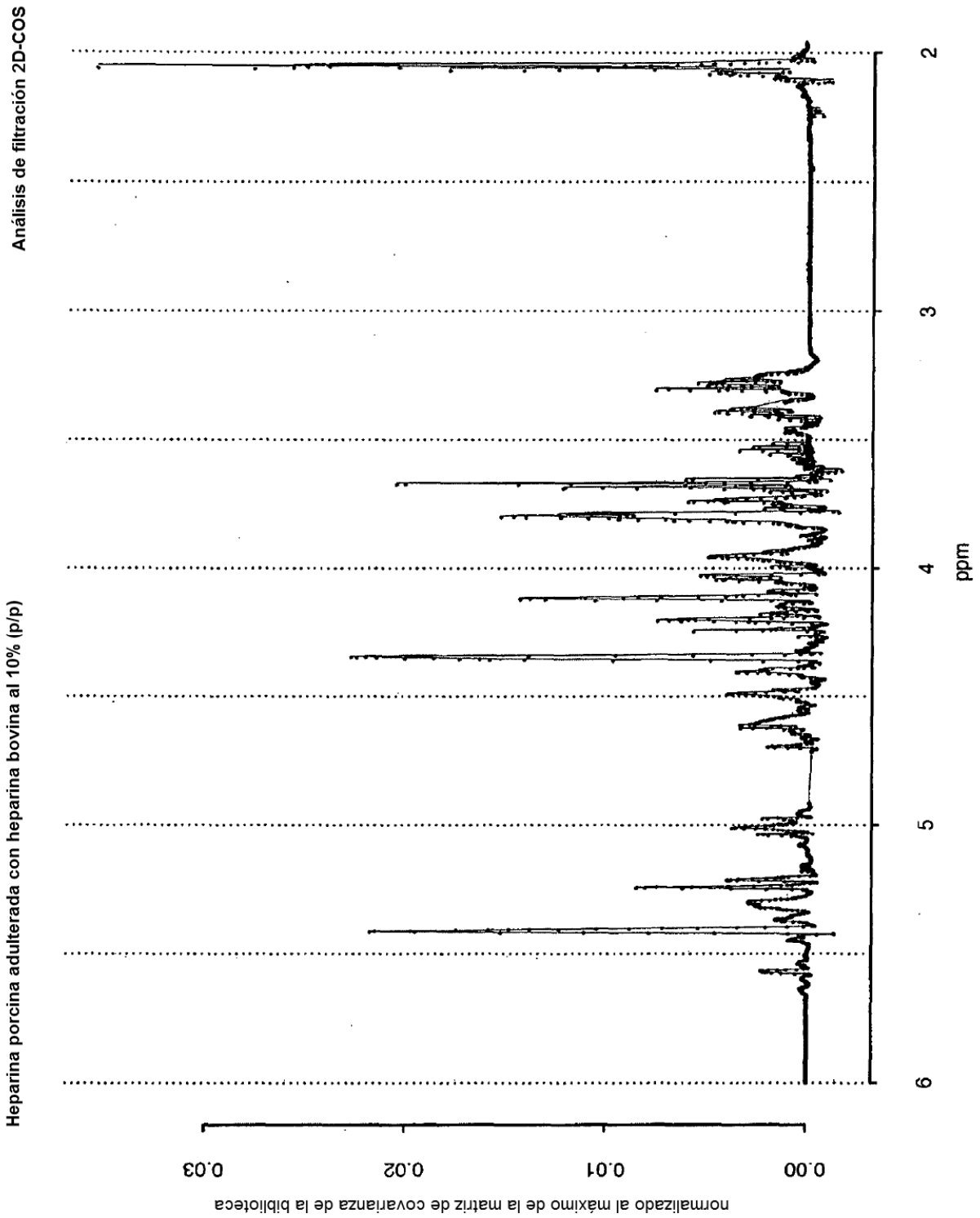


Figura 10

Análisis de filtración 2D-COS

Heparina porcina adulterada con heparina bovina al 10% (p/p) (línea continua)
Heparina porcina de referencia (+)

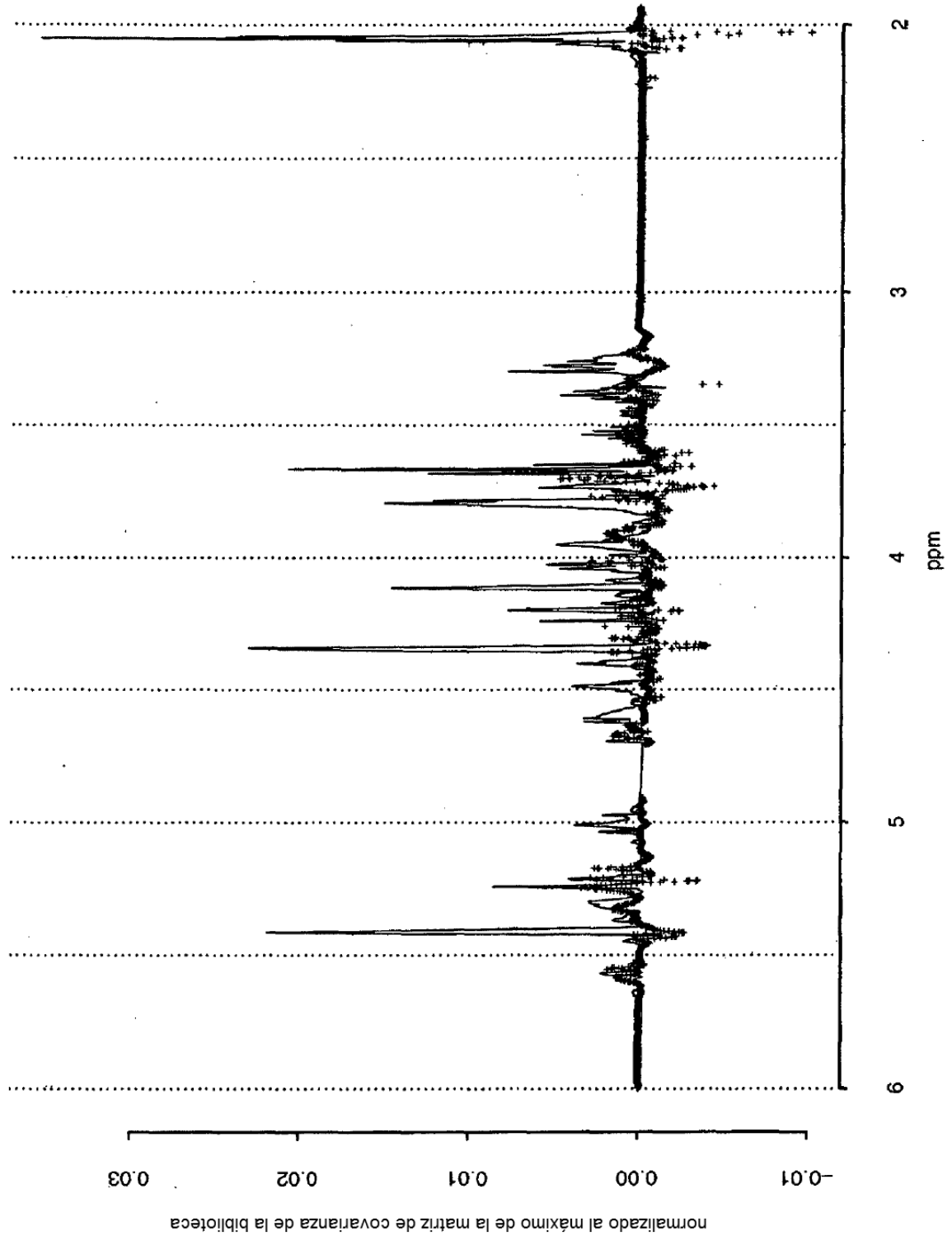


Figura 11

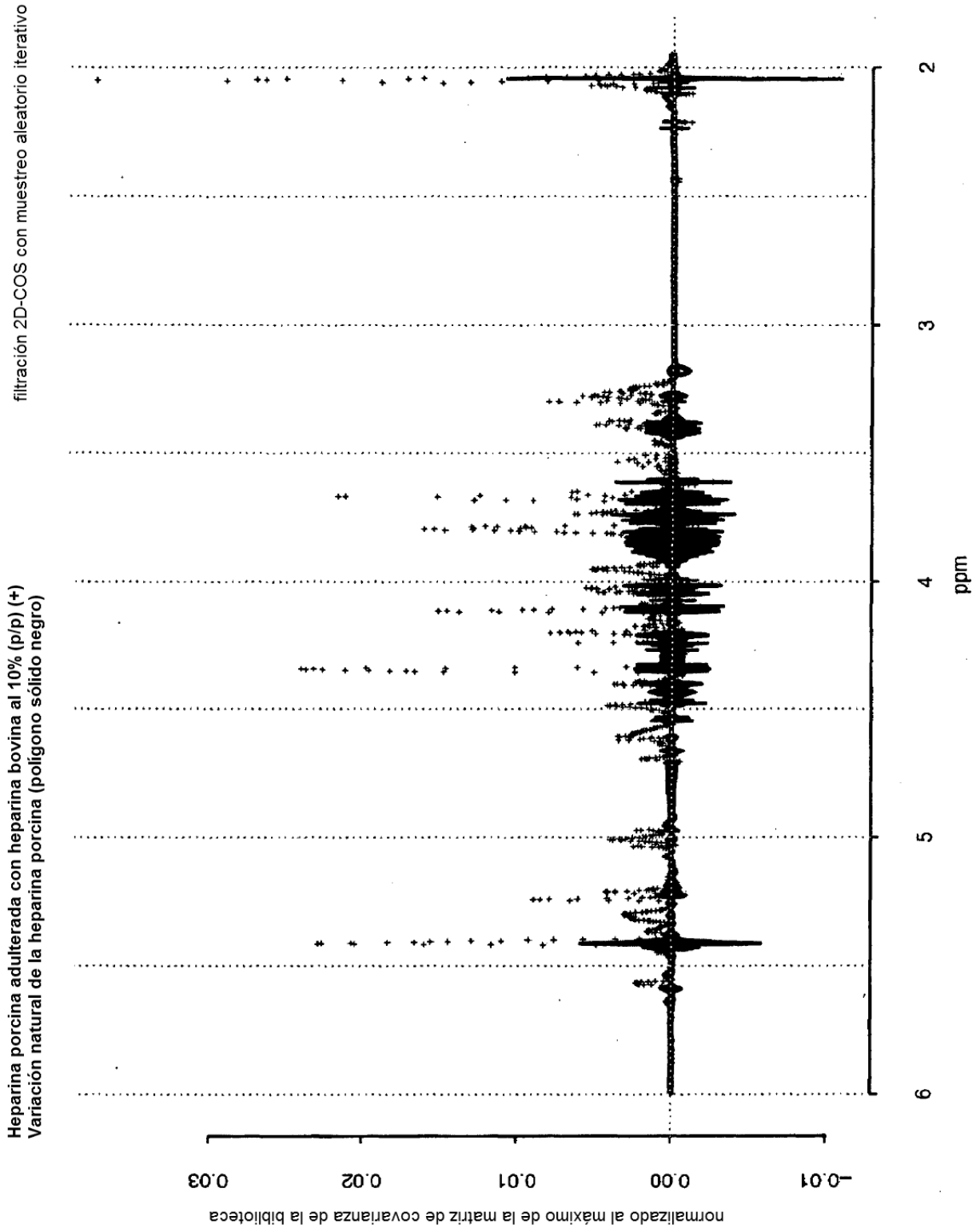


Figura 12

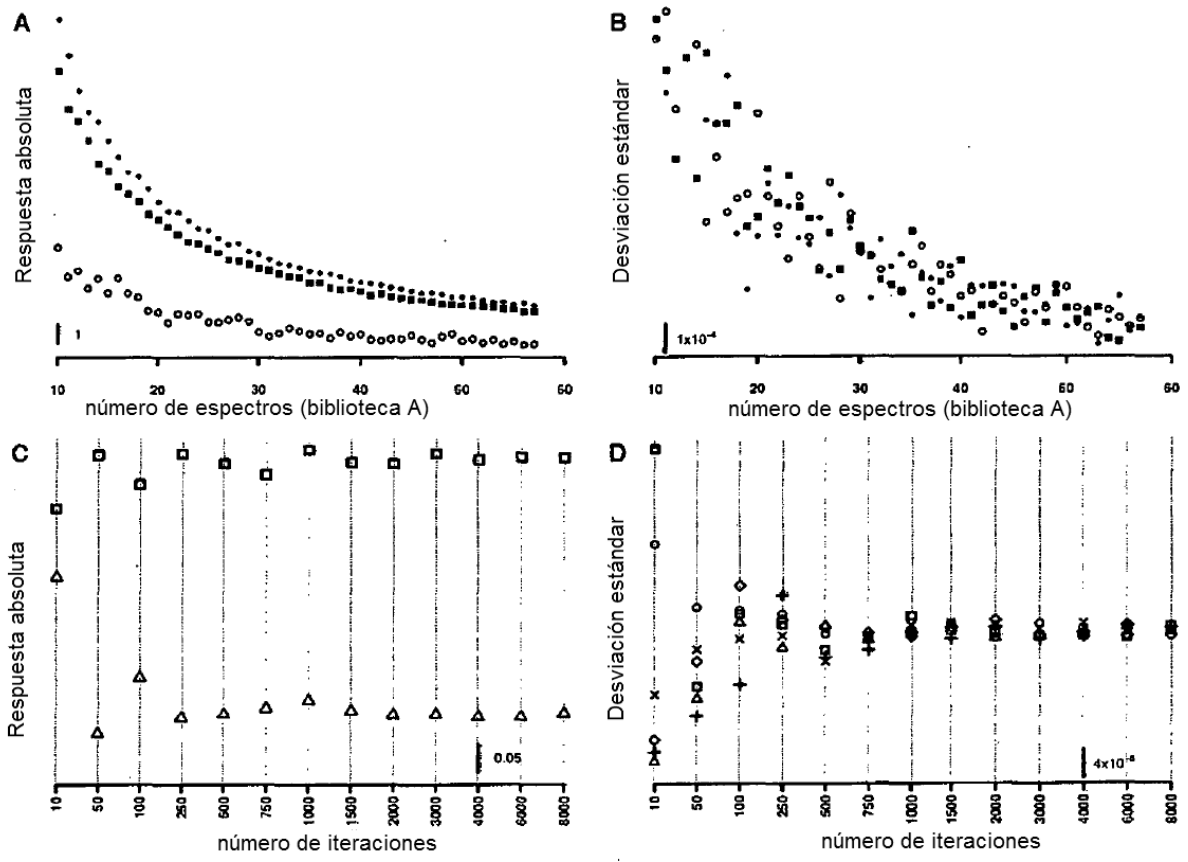


Figura 13

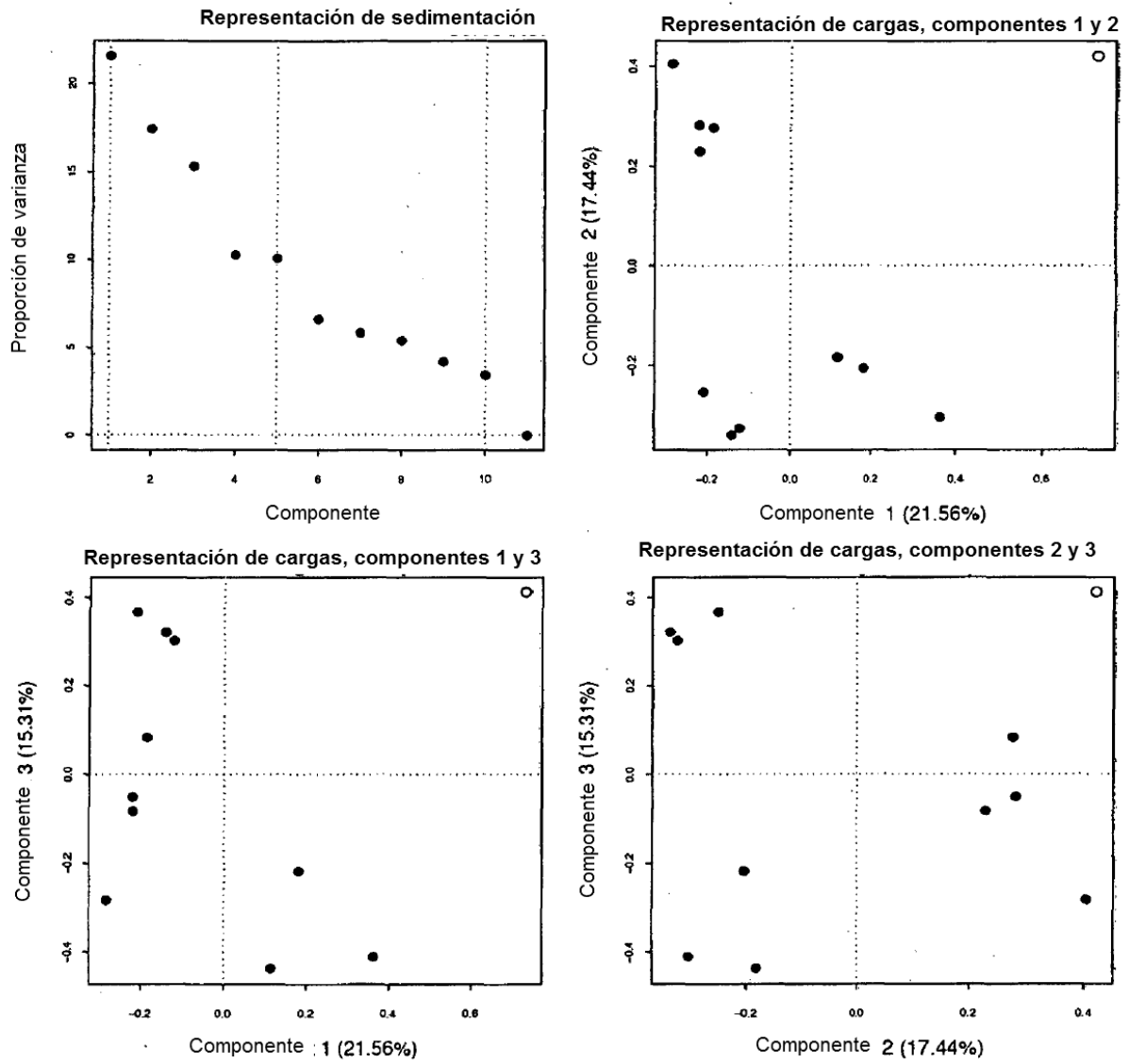


Figura 14

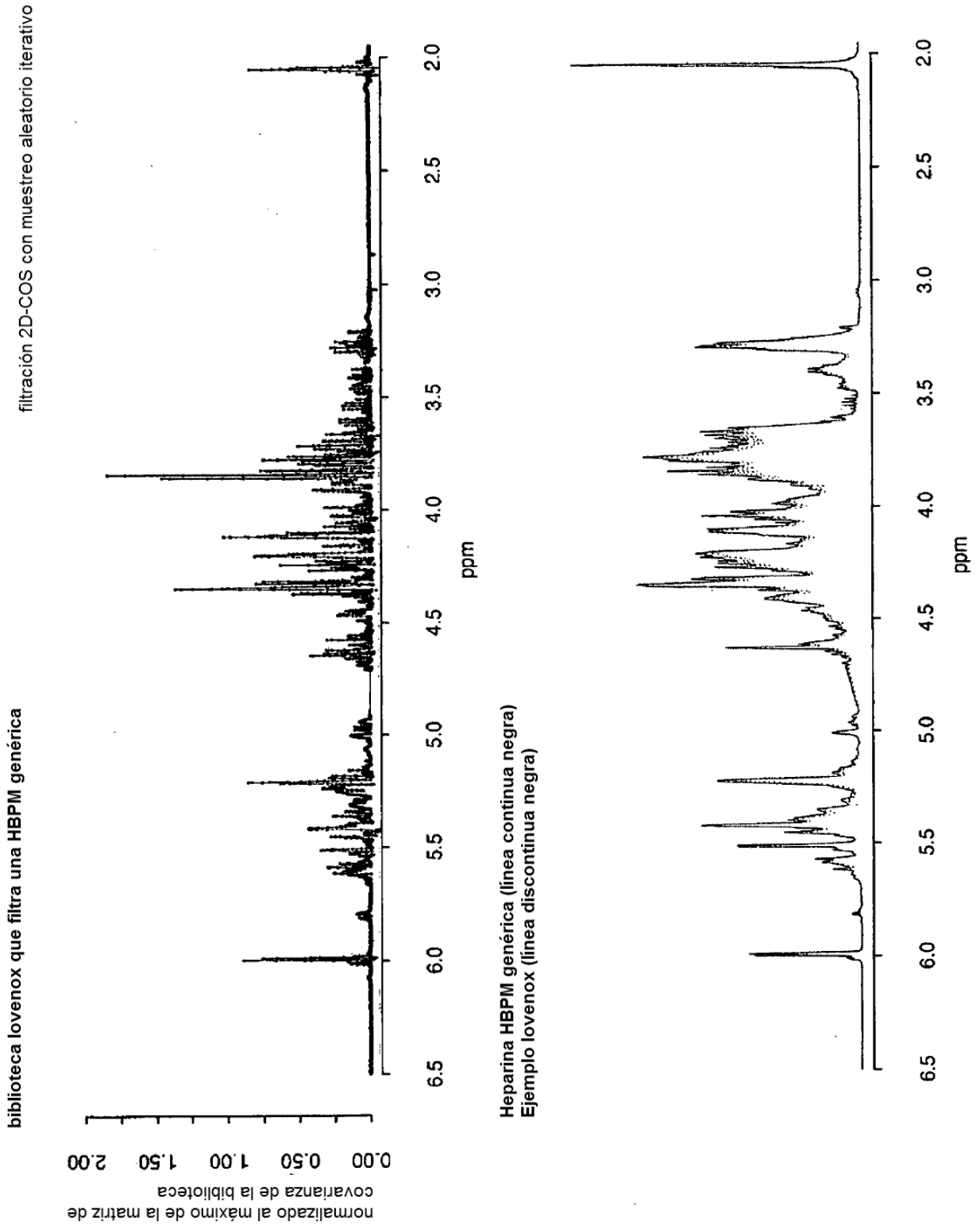


Figura 15