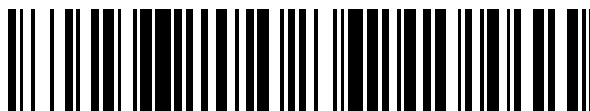


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 613**

51 Int. Cl.:

C08B 37/10 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61P 15/04 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2012 PCT/SE2012/051433**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13095279**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12858809 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2794665**

54 Título: **Glicosaminoglicanos no anticoagulantes que comprenden unidades de repetición de disacáridos y su uso médico**

30 Prioridad:

19.12.2011 US 201161577223 P

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

27.02.2018

73 Titular/es:

**DILAFOR AB (100.0%)
Karolinska Institutet Science Park, Fogdevreten
2A
171 65 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**EKRE, HANS-PETER;
ERIKSSON, PER-OLOV;
LINDAHL, ULF y
HOLMER, ERIK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 656 613 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

Glicosaminoglicanos no anticoagulantes que comprenden unidades de repetición de disacáridos y su uso médico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos glicosaminoglicanos modificados con baja actividad anticoagulante y a un procedimiento para su producción. El procedimiento de producción está específicamente adaptado para producir heparinas y sulfatos de heparina modificados con alta biodisponibilidad después de, por ejemplo, inyección parenteral y alta estabilidad estructural que da como resultado propiedades favorables de almacenamiento y manipulación.

Antecedentes

15 La heparina es un polisacárido polidisperso de origen natural que inhibe la coagulación, el proceso mediante el cual se produce la trombosis. La heparina consiste en cadenas de polisacáridos no ramificados de diferentes longitudes y pesos moleculares. Las cadenas de peso molecular de 5000 a más de 40.000 daltons componen la heparina de grado farmacéutico.

20 La heparina, derivada de fuentes naturales, principalmente intestino porcino o tejido de pulmón bovino, puede administrarse terapéuticamente para la prevención y el tratamiento de la trombosis. Sin embargo, los efectos de la heparina no fraccionada pueden ser difíciles de predecir. Durante el tratamiento de la trombosis con heparina no fraccionada, los parámetros de la coagulación deben controlarse muy de cerca para prevenir una anticoagulación excesiva o insuficiente.

25 Se encuentran disponibles numerosas marcas de heparinas y heparinas de bajo peso molecular (LMWH), tales como dalteparina y enoxaparina, para los tratamientos que dependen de su actividad anticoagulante. Un gran número de investigaciones experimentales *in vitro* y en animales, e incluso ensayos clínicos, indican que la heparina y sus derivados tienen propiedades beneficiosas distintas a las relacionadas con su efecto anticoagulante. Sin embargo, las heparinas existentes y las LMWH no son adecuadas para tratar otras afecciones médicas debido al riesgo de sangrado asociado con el efecto anticoagulante. Aunque las LMWH representan ventajas clínicas significativas en comparación con la heparina, esta clase de sustancias, por definición, aún retiene una alta actividad anticoagulante que puede dar lugar a efectos secundarios potencialmente mortales.

35 Debido a que puede administrarse por vía subcutánea y no requiere control del APTT, la LMWH permite el tratamiento ambulatorio de afecciones tales como la trombosis venosa profunda o la embolia pulmonar que anteriormente exigían la hospitalización de los pacientes para la administración de heparina no fraccionada.

40 La dalteparina de LMWH ha mostrado que disminuye el trabajo de parto prolongado en mujeres que reciben profilaxis para la trombosis venosa profunda. Se cree que el mecanismo involucra niveles mayores inducidos por dalteparina de interleuquinas que resultan en una reacción inflamatoria favorable que promueve la maduración del cuello uterino. Además, se ha demostrado que la dalteparina aumenta la contractilidad del útero (Acta Obstetricia et Gynecologica, 2010; 89: 147-150).

45 Sin embargo, la heparina y la LMWH no son adecuadas para prevenir o tratar tales enfermedades por varias razones. En primer lugar, la heparina y la LMWH tienen efectos anticoagulantes importantes y bien conocidos que restringen su uso al final del embarazo y durante el parto, tanto para uso profiláctico como para uso agudo, debido al riesgo de hemorragia. Por ejemplo, el uso de dalteparina está estrictamente contraindicado cuando se administra anestesia epidural, una medida que se toma frecuentemente durante el parto. En segundo lugar, la heparina se ha asociado con trombocitopenia inducida por heparina, una reacción farmacológica mediada por el sistema inmunitario grave que puede ocurrir en cualquier paciente expuesto a heparina. Es una enfermedad protrombótica potencialmente devastadora causada por anticuerpos dependientes de heparina que se desarrollan después de que un paciente ha recibido heparina durante 5 o más días o si el paciente ha tenido exposición previa a heparina. Otro posible efecto desfavorable del tratamiento a largo plazo con heparina es que puede inducir la desmineralización de los huesos y causar osteoporosis.

55 Se han realizado muchos intentos para erradicar o reducir la actividad anticoagulante de heparinas o heparinas de bajo peso molecular para proporcionar heparinas anticoagulantes bajas (LAH) que pretenden beneficiarse de otros efectos clínicos potenciales de las cadenas de heparina diferentes al efecto anticoagulante, sin acarrear el riesgo de efectos adversos asociados con la heparina, predominantemente hemorragia. Sin embargo, hay una experiencia clínica limitada de este tipo de heparinas y hasta ahora no se permiten dichos productos para uso clínico.

60 La patente europea 1059304 divulga heparina enzimáticamente degradada u oxidada que da como resultado un producto con bajo efecto anticoagulante, que tiene un peso molecular medio de 9 a 13 kDa, que se sugiere para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

65

El documento US 4.990.502 demuestra una forma de tratar la heparina nativa para escindir residuos de los residuos de pentasacáridos responsables del efecto anticoagulante y una despolimerización posterior que da como resultado una heparina de bajo peso molecular y capacidad anticoagulante baja con un peso molecular promedio de 5,8 a 7,0 kDa. En el documento US 4.990.502 se usan procedimientos dispendiosos que consumen mucho tiempo, tal como diálisis durante aproximadamente 15 horas, para finalizar el proceso de oxidación. Dichos procesos podrían afectar la distribución del peso molecular del producto final. Controlar el peso molecular y la longitud de las cadenas de polisacáridos es crucial para obtener el efecto biológico deseado del compuesto.

La biodisponibilidad de heparinas de cadena larga después de la dosificación subcutánea es baja y la posibilidad de inducción de trombocitopenia inducida por heparina (HIT) también se correlaciona positivamente con las longitudes de cadena. Para reducir estas propiedades clínicamente indeseadas, el derivado de heparina no debe ser de longitud completa. Las cadenas de heparina de cierto peso molecular se pueden obtener por fraccionamiento de heparina estándar. Sin embargo, la producción de derivados de heparina de peso molecular medio o bajo por procedimientos de fraccionamiento tales como filtración en gel, precipitación con alcohol y cromatografía de intercambio iónico está asociada con un desperdicio significativo de materia prima ya que se descartan heparinas de alto peso molecular.

La presente invención, como se expone en las siguientes secciones, describe un nuevo proceso en el que las cadenas de polisacáridos se acortan y se logra una distribución adecuada de peso molecular medio favoreciendo su uso clínico y reduciendo el riesgo asociado con las cadenas de polisacáridos más grandes junto con una pérdida mínima de materia prima.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra un esquema de la síntesis de una heparina de baja anticoagulación de acuerdo con la invención.

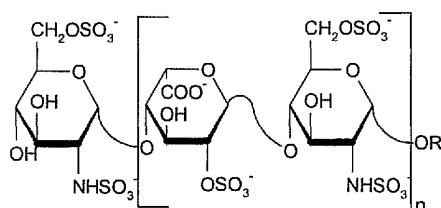
La Figura 2 muestra los resultados del estudio de estabilidad sobre la sustancia farmacológica.

La Figura 3 muestra los resultados del estudio de estabilidad en el producto farmacológico.

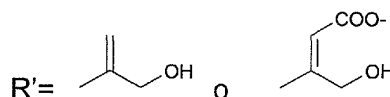
Sumario

La presente invención se refiere a glicosaminoglicanos químicamente modificados seleccionados entre heparinas y sulfatos de heparano con una actividad del antifactor IIa de menos de 10 IU/mg, una actividad del antifactor Xa de menos de 10 IU/mg y un peso molecular promedio (peso promedio, Mw) de aproximadamente 4,6 a 6,9 kDa, en el que:

- el sacárido predominantemente presente es (Fórmula I)



en la que



n es un número entero de 2 a 20, de modo que las cadenas de polisacáridos tienen de 2 a 20 unidades de disacáridos que corresponden a pesos moleculares entre 1,2 y 12 kDa; y

las cadenas de polisacáridos están esencialmente libres de ácidos idurónico y/o glucurónico no sulfatados químicamente intactos a partir de secuencias de pentasacáridos que median el efecto anticoagulante; y

los glicosaminoglicanos modificados químicamente tienen una distribución de polisacáridos y su correspondiente peso molecular expresado como % acumulado de peso de acuerdo con la tabla:

Peso molecular, kDa	Peso acumulado, %
>10	4-15
>8	10-25
>6	22-45
>3	>70

La invención se refiere además a sus usos y a un procedimiento para su producción.

5 Descripción detallada de la invención

En términos generales, la presente invención se refiere a heparinas modificadas químicamente y sulfatos de heparano que se preparan selectivamente para retener los efectos terapéuticos de las cadenas de polisacáridos y para producir una distribución de tamaño óptima de las cadenas de polisacáridos para asegurar una alta biodisponibilidad y estabilidad, teniendo también un bajo efecto anticoagulante y, por lo tanto, eliminando esencialmente el riesgo de hemorragia.

La presente invención también asegurará un proceso de alto rendimiento que puede escalarse para producir un producto comercializable con un costo favorable de los bienes. Tanto el costo de producción como la disponibilidad de materias primas se convierten en factores importantes para la adquisición de un producto farmacéutico. La posibilidad de modificar heparinas no fraccionadas en un derivado farmacológicamente aceptable con una distribución de longitud de cadena favorable permite la administración parenteral con una alta biodisponibilidad. Además, esto permitiría el tratamiento fuera de la clínica, tal como auto tratamiento, que es beneficioso desde una perspectiva socioeconómica.

Se usan varios términos y definiciones en el siguiente contexto de descripción de la invención en un contexto general y en un contexto detallado o experimental.

Debe observarse que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, el término "aproximadamente" se usa para indicar una desviación de +/- 2 % del valor dado, preferiblemente +/- 5 %, y lo más preferiblemente +/- 10 % de los valores numéricos, cuando corresponda.

La heparina es un glicosaminoglicano de origen natural que se sintetiza y almacena intracelularmente en los denominados mastocitos en humanos y animales. Preparada industrialmente, principalmente a partir de la mucosa intestinal porcina, la heparina es un potente anticoagulante y se ha utilizado clínicamente durante más de 60 años como el fármaco de preferencia para la profilaxis y el tratamiento de los trastornos tromboembólicos. Los principales efectos adversos potenciales del tratamiento con heparina son complicaciones hemorrágicas causadas por sus propiedades anticoagulantes.

La heparina es altamente polidispersa y está compuesta de una población heterogénea de polisacáridos con pesos moleculares que varían de 5 a 40 kDa, siendo el promedio de aproximadamente 15 a 18 kDa.

Las heparinas de bajo peso molecular/masa (LMWH) de acuerdo con la farmacopea europea se definen como "sales de GAG sulfatadas que tienen una masa molecular promedio en masa menor de 8 kDa y para las cuales al menos 60 por ciento de la masa total tiene una masa molecular menor a 8 kDa. Muestran diferentes estructuras químicas en el extremo reductor o no reductor de las cadenas de polisacáridos. La potencia no es inferior a 70 IU de actividad antifactor Xa por miligramo calculado con referencia a la sustancia seca. La relación entre la actividad antifactor Xa y la actividad antifactor IIa no es inferior a 1,5". Las LMWH clínicamente utilizadas tienen pesos moleculares que varían de 3 a 15 kDa con un promedio de aproximadamente 4 a 7 kDa. Producida por despolimerización controlada de heparina, las LMWH exhiben propiedades farmacológicas y farmacocinéticas más favorables en comparación con la heparina no fraccionada, que incluyen una menor tendencia a inducir hemorragia, una mayor biodisponibilidad y una semivida prolongada después de la inyección subcutánea.

El sulfato de heparano es un polisacárido lineal, en general, menos sulfatado que la heparina, que se puede preparar a partir de mucosa intestinal porcina o de pulmón bovino, a partir de fracciones laterales de heparina usando fraccionamiento con cloruro de cetilpiridinio y extracción secuencial con sal como los describen Fransson et al., Structural studies on heparan sulfates, Eur. J. Biochem. 106, 59-69 (1980). El sulfato de heparano está compuesto por glucosamina y fracciones de ácido urónico alternados, las unidades de disacáridos resultantes están N-acetiladas, N-sulfatadas o (en menor medida) N-no sustituidas, y dispuestas principalmente en forma de dominio.

Algunos sulfatos de heparano poseen actividad anticoagulante dependiendo de la presencia de un pentasacárido anticoagulante específico, aunque considerablemente menos que la heparina.

La heparina ejerce su actividad anticoagulante principalmente mediante la unión de alta afinidad y activación del inhibidor de serina proteinasa, antitrombina (AT). AT, un importante inhibidor fisiológico de coagulación sanguínea, neutraliza los factores de coagulación activados formando un complejo estable con estos factores. La unión de un pentasacárido específico dentro de las cadenas de polisacáridos de heparina provoca un cambio conformacional en la AT que aumenta drásticamente la tasa de inhibición de los factores de coagulación, atenuando de este modo la coagulación sanguínea y la formación de coágulos sanguíneos.

La secuencia de pentasacáridos específica única, distribuida al azar dentro de polímeros de heparina, es esencial para la unión a AT. Varias características estructurales de esta secuencia han demostrado ser cruciales para la interacción de heparina con AT. Notablemente, el residuo de ácido idurónico presente en esta secuencia de pentasacáridos está consistentemente sulfatado en la posición C-2; mientras que los grupos hidroxilo tanto en C-2 como en C-3 del ácido glucurónico no están sustituidos (Fórmula II).



Fórmula II

Las variantes estructurales compatibles con la actividad anticoagulante incluyen la sustitución de N-acetilo en lugar de N-sulfato de la unidad GlcN hacia el terminal no reductor, y grupos C6-hidroxilo no sustituidos en lugar de 6-O-sulfatado en los otros dos residuos de GlcN.

Mediante la aplicación del proceso divulgado en esta memoria, la interacción con AT se desactiva y, por lo tanto, la actividad de anticoagulación se agota esencialmente.

En el contexto de la presente invención, la actividad anticoagulante del glicosaminoglicano se refiere a la función clínica de potenciación de la inhibición de los factores de coagulación Xa y IIa (trombina) por AT. En una realización, no hay esencialmente actividad anticoagulante de los glicosaminoglicanos modificados químicamente de acuerdo con la invención.

En el proceso de preparación de una heparina de baja anticoagulación, es importante evitar, o contrarrestar la despolimerización no específica, es decir, efectos de despolimerización no atribuibles a los resultados predecibles obtenidos a partir de la hidrólisis de la eliminación beta alcalina, la etapa de despolimerización misma. La despolimerización no específica puede dar como resultado una pérdida impredecible de peso molecular, productos decolorados (con valores de absorbancia inestables), otros problemas de estabilidad y la aparición de residuos no identificados y residuos que no se predice que lleguen del procesamiento de heparina o heparinas de bajo peso molecular. Los productos sometidos a una despolimerización no específica pueden obtener una distribución de peso molecular desfavorable e inestable de los polisacáridos.

Un aspecto importante de la invención es controlar la despolimerización para obtener un producto con una distribución de cadena óptima y características de estabilidad favorables. En un aspecto, la despolimerización se controla mediante el control de las condiciones bajo las cuales se admite que el peryodato y también el yodato resultante ejercen su ataque oxidativo sobre la heparina. El procedimiento según la invención se ha optimizado para minimizar la despolimerización no específica que afecta negativamente a la distribución y estabilidad de la cadena.

Se definirán otros términos en contextos relevantes en la siguiente descripción.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar glicosaminoglicanos químicamente modificados seleccionados entre heparinas y sulfatos de heparano con una actividad antifactor IIa de menos de 10 IU/mg, una actividad antifactor Xa de menos de 10 IU/mg y un peso molecular promedio (peso promedio, Mw) de aproximadamente 4,6 a aproximadamente 6,9 kDa. El procedimiento comprende una etapa de oxidación selectiva de heparina no fraccionada o sulfato de heparano presente en una solución acuosa sometiéndola a un agente oxidante capaz de oxidar ácidos urónicos no sulfatados y reducir los sacáridos oxidados resultantes. El procedimiento también comprende despolimerizar las cadenas de heparina mediante hidrólisis básica.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- oxidación de ácidos glucurónico e idurónico por tratamiento con peryodato;

-
- eliminación o minimización de los efectos de oxidación de los compuestos que contienen yodo;
-
- despolimerización de cadenas de polisacáridos en condiciones alcalinas (un proceso de eliminación beta); y
-
- reducción y estabilización de grupos aldehído terminales a través de una reacción con un agente reductor, tal como NaBH₄.

En un aspecto adicional, el procedimiento también comprende uno o más de las siguientes etapas:

- purificación final del producto por eliminación de borato (NaBH₄ oxidado), eliminación de pequeños fragmentos de glicosaminoglicano, adición de contraiones y aislamiento del producto en forma sólida;
-
- secado del producto al vacío y por calor o como un proceso de liofilización para permitir el almacenamiento del producto a largo plazo del producto;
-
- disolución y formulación del producto en una solución acuosa regulada con fosfato, ajuste del pH a 6-8. Adición de excipientes con el fin de ajustar la tonicidad; y
-
- llenado aséptico del producto en viales o jeringas o liofilización en los mismos.

El procedimiento se realiza en la secuencia de oxidación, despolimerización con hidrólisis y reducción y que comprende más específicamente las siguientes etapas:

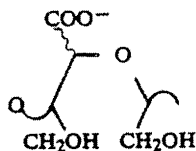
- a) oxidación de ácidos glucurónico e idurónico por tratamiento con peryodato;
- b) eliminación o minimización de los efectos de oxidación de compuestos que contienen yodo;
- c) despolimerización de cadenas de polisacáridos en condiciones alcalinas (un proceso de eliminación beta); y
- d) reducción y estabilización de grupos aldehído terminales a través de una reacción con un agente reductor, tal como NaBH₄.

En un aspecto adicional, el procedimiento también comprende uno o más de las siguientes etapas:

- e) purificación final del producto por eliminación de borato (NaBH₄ oxidado), eliminación de pequeños fragmentos de glicosaminoglicano, adición de contraiones y aislamiento del producto en forma sólida;
- f) secado del producto al vacío y por calor o como un proceso de liofilización para permitir el almacenamiento del producto a largo plazo;
- g) disolución y formulación del producto en una solución acuosa regulada con fosfato, ajuste del pH a 6-8. Adición de excipientes con el fin de ajustar la tonicidad; y
- h) llenado aséptico del producto en viales o jeringas o liofilización en los mismos.

En un aspecto preferido del procedimiento, el glicosaminoglicano químicamente modificado es heparina no fraccionada y los ácidos glucurónico no sulfatado y/o idurónico no sulfatado selectivamente se oxidan, inhibiendo de este modo el efecto anticoagulante mediado por la interacción entre ATIII y el pentasacárido específico. La oxidación divide un ácido urónico no sulfatado con 2 hidroxilos libres vecinales, en C2 y C3 en el pentasacárido responsable de la unión a AT. Como ejemplo no limitante, la composición de heparina no fraccionada se trata con peryodato tal como metaperyodato, por ejemplo, heparina no fraccionada disuelta en agua desionizada y metaperyodato de sodio en proporciones adecuadas. Otros agentes de oxidación serían útiles si tienen el mismo impacto químico en la eficacia de oxidación y en los residuos no sulfatados, sin afectar otras estructuras o la estabilidad del producto final.

De acuerdo con un aspecto diferente, el glicosaminoglicano químicamente modificado de acuerdo con la invención comprende residuos divididos en glicol con la estructura química (Fórmula III):



Los residuos divididos en glicol aparecen en las cadenas de polisacáridos de las heparinas modificadas químicamente, como resultado de los procesos de oxidación y reducción, como se discutió anteriormente en el contexto con el procedimiento y la etapa de hidrólisis específica. El residuo de glicol representado proviene de la oxidación y la reducción de ácido idurónico y ácido glucurónico no sulfatados.

5 Para obtener la oxidación completa, la etapa de oxidación se realiza preferiblemente a una temperatura superior a 10 °C, preferiblemente a aproximadamente 15 ± 2 °C, y se lleva a cabo durante al menos 15 horas, y preferiblemente durante aproximadamente 18-24 horas.

10 En la realización, la oxidación con peryodato se realiza en una solución con una concentración inicial de glicosaminoglicano (por ejemplo, heparina) de aproximadamente 10-20 % p/v, preferiblemente aproximadamente 15 % p/v. Esta alta concentración de materia prima está contribuyendo a una economía favorable del proceso ya que las etapas de precipitación realizadas posteriormente en el proceso se basan en volúmenes de disolvente/volumen del producto.

15 En una realización específica, la etapa de oxidación se lleva a cabo mediante la adición de metaperyodato, a una temperatura de aproximadamente 15 ± 2 °C, con una concentración de glicosaminoglicano (por ejemplo, heparina o sulfato de heparano) de aproximadamente 15 % y a un pH de aproximadamente 5 durante aproximadamente 18-24 horas.

20 El empleo de heparina no fraccionada en el proceso se considera generalmente ventajoso para la invención, ya que contribuirá a reducir el desperdicio de material y aumentar la eficacia de costos y respaldará la provisión de un producto de composición con longitud de cadena de polisacárido intermedia y biodisponibilidad favorable. Después de la oxidación con peryodato, los procedimientos descritos en la presente memoria pueden comprender además al menos una etapa de terminación de la oxidación y eliminación del agente oxidante restante. Al menos una etapa de eliminación incluye la eliminación de formas reducidas del agente oxidante. En este contexto, las formas reducidas significan un agente oxidante transformado a formas reducidas que contribuyen a la oxidación de residuos de sacáridos objetivo en los glicosaminoglicanos de la invención. También en este contexto, la etapa de reducción puede comprender la adición de un agente reductor que además de reducir el glicosaminoglicano oxidado contribuye a consumir (reducir) el agente oxidante restante.

30 Por consiguiente, se describe en la presente memoria un procedimiento con las etapas de oxidar selectivamente un glicosaminoglicano no fraccionado, tal como heparina o sulfato de heparano, someténdolo a un agente oxidante capaz de oxidar sacáridos no sulfatados; eliminando el agente oxidante restante y las formas reducidas de agente oxidante; y despolimerizar las cadenas de glicosaminoglicanos bajo condiciones alcalinas. Para estos fines, la etapa de eliminación puede comprender la adición de un alcohol, tal como un alcohol acuoso, en una cantidad suficiente para que precipite el glicosaminoglicano químicamente modificado. El alcohol puede ser metanol, propanol, etanol o alcoholes similares y admite que el glicosaminoglicano químicamente modificado se precipite, mientras que el agente oxidante y sus formas reducidas se eliminan con el alcohol. La precipitación se puede realizar una vez o repetirse una o varias veces para optimizar la eliminación. Sin embargo, realizar la precipitación solo una vez podría ser beneficioso ya que requiere menos tiempo y reduce el tiempo de exposición entre los compuestos que contienen yodo residual y el glicosaminoglicano.

35 La etapa de eliminación también puede incluir la adición de un agente de inactivación capaz de inactivar químicamente el agente oxidante para ejercer adicionalmente efectos oxidantes sobre el glicosaminoglicano. Se puede usar cualquier inhibidor que tenga dos grupos hidroxilo vecinales. Los ejemplos no limitantes de inhibidores adecuados son etilenglicol y glicerol. Al agregar un inhibidor que contiene grupos dihidroxilo vecinales, el peryodato se convierte en yodato menos nocivo directamente al final de la etapa de oxidación.

40 Generalmente, los inventores consideran que la etapa de eliminación descrita o las etapas de eliminación contribuyen a contrarrestar o minimizar la despolimerización no específica del glicosaminoglicano, es decir, efectos de despolimerización no atribuibles a los resultados predecibles del proceso de despolimerización alcalina. Como se mencionó anteriormente, la despolimerización no específica puede dar como resultado una reducción impredecible de peso molecular, productos decolorados (con valores de absorbancia crecientes durante el almacenamiento), otros problemas de estabilidad y la aparición de residuos no identificados que no se predice que lleguen en glicosaminoglicanos tales como heparina o heparinas de bajo peso molecular.

45 La introducción de una etapa de eliminación permite un control mejorado sobre cualquier despolimerización no específica. Otra forma de controlar la despolimerización no específica, aplicable con cualquier procedimiento descrito anteriormente, es reducir la temperatura significativamente por debajo de la temperatura ambiente (ambiente) durante la etapa o etapas previas de precipitación cuando se agrega un alcohol. Por ejemplo, la temperatura puede reducirse hasta aproximadamente 5 °C con el fin de evitar reacciones indeseadas que den como resultado una despolimerización no específica.

60 Como alternativa, las etapas de proceso a), b) c) y d) se realizan en una secuencia directa, preferiblemente sin ningún retraso. En "secuencia directa" en este contexto, significa que las etapas se realizan sin ninguna etapa

intermedia de precipitación. Es particularmente importante minimizar el tiempo transcurrido desde el final de la etapa de oxidación hasta el inicio de la etapa de reducción.

De acuerdo con la invención, las etapas de proceso a), b), c) y d) se realizan en una secuencia directa, preferiblemente sin ningún retraso. En "secuencia directa" en este contexto, significa que las etapas se realizan sin ninguna etapa intermedia de precipitación. En este aspecto, la etapa de eliminar o minimizar los efectos de la oxidación de compuestos de yodo comprende controlar el tiempo de exposición para cualquier compuesto de yodo oxidante remanente para ejercer cualquier efecto químico incontrolado sobre los polisacáridos entre la terminación de la etapa de oxidación selectiva y el inicio de la etapa de reducción.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es minimizar el tiempo transcurrido desde el final de la etapa de oxidación hasta el inicio de la etapa de reducción, es decir, desde el comienzo de la despolimerización (adición de una base) hasta la adición del borohidruro. El tiempo transcurrido entre el final de la etapa de oxidación hasta la adición del borohidruro es de aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 6 horas. En otro aspecto, el tiempo transcurrido entre el final de la etapa de oxidación hasta la adición del borohidruro no es más de aproximadamente 5 horas, preferiblemente no más de aproximadamente 4 horas, más preferiblemente no más de aproximadamente 3 horas, y lo más preferible no más de aproximadamente 2 horas. El tiempo mínimo requerido se determinaría a partir del progreso de la despolimerización que se controla por el pH de la reacción. En un aspecto, el tiempo mínimo requerido es aproximadamente 1 hora. El pH inferior como se describe por ejemplo en el Ejemplo 3 daría como resultado el tiempo requerido más largo y viceversa para un pH más alto. Las tres etapas se pueden realizar ventajosamente en el mismo contenedor. Este proceso alternativamente tiene la ventaja de reducir el tiempo de exposición de la heparina o del sulfato de heparano a los compuestos que contienen yodo desde el final de la oxidación con peryodato hasta que se eliminan mediante el borohidruro reductor en la etapa de reducción. La adición del borohidruro inactivará inmediatamente el peryodato residual y lo convertirá en otro, para el producto menos nocivo, formas inertes tales como yoduro y yodo. El borohidruro se debe añadir en una cantidad tal para inactivar eficazmente el peryodato residual y reducir los grupos aldehído terminales. El resultado positivo de compactar el proceso de esta manera se demuestra en las tablas II y III.

Después de la terminación de la etapa de oxidación, las cadenas de polisacáridos se despolimerizan bajo condiciones alcalinas. La despolimerización se realiza preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 5- 25 °C con el fin de obtener cadenas adecuadamente fraccionadas con pesos moleculares deseables. El pH de la reacción de despolimerización está entre aproximadamente 10-12, para conservar los grupos 2-O-sulfato de residuos de ácido urónico sulfatados y evitar el aumento de la coloración amarilla del producto a un pH mayor. Esto último afectaría la semivida del producto, ya que es un indicador de calidad/estabilidad del producto. Se aplica el requisito de caracterizar el color como un indicador de la degradación del producto. El pH preferiblemente no debería llegar a 13 (NaOH 0,1 N o superior) debido al riesgo de desulfatación del ácido urónico 2-O sulfatado e incluso una mayor coloración del producto. El tiempo de reacción es preferiblemente de aproximadamente 15-95 minutos para lograr una reacción apropiada con respecto a la escisión suficiente de los ácidos urónicos oxidados no sulfatados.

Los glicosaminoglicanos oxidados se tratan posteriormente con un agente reductor, por ejemplo, borohidruro de sodio, para reducir los grupos aldehído terminales. Este proceso está diseñado para reducir los extremos terminales que contienen aldehído y convertirlos en alcoholes primarios hasta tal punto que los aldehídos no serían detectables mediante, por ejemplo, análisis RMN ¹³C. Este alto grado de reducción de los extremos terminales reductores contribuye a una alta estabilidad del producto ya que los aldehídos son inherentemente químicamente lábiles. Otra razón para eliminar los aldehídos es que pueden ser potencialmente tóxicos. Se pueden concebir otros agentes reductores si son capaces de realizar una etapa reductora específica similar de residuos ácido glucurónico/idurónico oxidados como borohidruro de sodio sin modificar innecesariamente o destruir los grupos sulfato de otros sacáridos. Las cadenas así reducidas se pueden aislar, por ejemplo, mediante precipitación con alcohol.

Para soportar la selección de cadenas deseables, el procedimiento también puede incluir una etapa de enriquecimiento de derivados de heparina o sulfato de heparano en cadenas de polisacáridos que tienen un peso molecular de aproximadamente más de 3 hasta aproximadamente 12 kDa. La etapa de enriquecimiento generalmente incluye procedimientos convencionales de precipitación, cromatografía, filtración o tamizado molecular bien conocidos por los expertos en la fabricación de biopolímeros.

Se optimizaron los parámetros para las etapas de precipitación (concentración del producto, concentración de disolvente orgánico, pH y contraiones adicionales) para retener polisacáridos superiores a 3 kDa.

Se ha desarrollado una nueva metodología de alto rendimiento en la que se minimiza la despolimerización no específica. En un aspecto, se produce la terminación simultánea de la reacción de oxidación, la eliminación de compuestos de yodo y la precipitación de las heparinas modificadas o sulfatos de heparano. Esto es ventajoso ya que los compuestos de yodo que pueden ser perjudiciales para el producto permanecen solubles en la solución acuosa de etanol y se eliminan con la precipitación. Esto contrasta con los procedimientos anteriores, por ejemplo, el procedimiento en el documento US 4.990.502, en el que se usa diálisis o intercambio iónico, que son procedimientos lentos. La diálisis es una técnica engorrosa que rara vez se practica. El saneamiento del equipo debería ser integral para evitar la contaminación microbiana.

En la invención, del 4 al 15 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 10 kDa.

5 En la invención, del 10 al 25 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 8 kDa.

En la invención, del 22 al 45 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 6 kDa.

10 En la invención, al menos el 70 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 3 kDa.

15 Al realizar las etapas del procedimiento de acuerdo con la presente invención, se obtiene una heparina de baja anticoagulación con una especificación de peso molecular de polisacáridos que cae dentro de la distribución descrita en la Tabla I.

Tabla I. Distribución de polisacáridos y su masa molecular correspondiente como % acumulado de peso para varios lotes.

Masa molecular, kDa	Peso acumulado, %
>10	4-15
>8	10-25
>6	22-45
>3	>70

20 El valor correspondiente para el peso molecular promedio ponderado, Mw, cae en el intervalo de 4,6-6,9 kDa.

En un aspecto de la invención, el glicosaminoglicano químicamente modificado tiene un contenido bajo y controlado de residuos de glucosamina químicamente modificados como resultado de las etapas de proceso de su fabricación.

25 En un aspecto de la invención, los glicosaminoglicanos químicamente modificados comprenden glucosaminas presentes como señales en el intervalo de 5,0 a 6,5 en el espectro de RMN ¹H con la intensidad (relación en %) de menos del 4 % en relación con la señal a 5,42 ppm a partir de heparina nativa.

30 En un aspecto, tales señales de las señales de glucosamina modificadas están presentes a 6,15 ppm y 5,95 ppm en el espectro de RMN ¹H.

En un aspecto de la invención, el glicosaminoglicano comprende menos del 1 % de glucosaminas modificadas del contenido total de glucosamina. Dichas glucosaminas modificadas pueden estar ubicadas en los extremos no reductores de las cadenas de polisacáridos y pueden incluir un doble enlace C4-C5 en la estructura del residuo. Tales glucosaminas modificadas pueden producir señales a 5,95 ppm y 6,15 ppm en un espectro de RMN ¹H.

35 Las glucosaminas químicamente modificadas arriban a partir de los residuos de glucosamina susceptibles de modificación durante las etapas del procedimiento de producción y pueden contribuir a los fenómenos discutidos con despolimerización no específica y características impredecibles del producto glicosaminoglicano.

40 En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento que minimiza tanto la despolimerización no específica como la aparición de glucosaminas químicamente modificadas controlando la exposición de los glicosaminoglicanos a los agentes en las etapas del proceso que contribuyen a modificar las glucosaminas responsables.

45 En consecuencia, los procedimientos de la invención contribuyen a minimizar la modificación de glucosaminas responsables frente a residuos imprevistos o desconocidos en las cadenas de polisacáridos. Los procedimientos contribuyen así a generar productos adecuadamente cercanos a la heparina o heparina de bajo peso molecular que pueden cumplir los criterios de aceptación actuales para la heparina establecidos por EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare), Council of Europe, 2012 (Criterio de aceptación de RMN H).

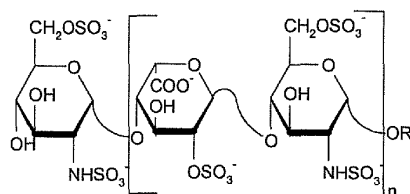
50 Para este fin, un aspecto del procedimiento de la invención comprende una etapa de eliminar o minimizar los efectos del agente oxidante usado para oxidar selectivamente el glicosaminoglicano. Cuando el agente oxidante es el compuesto de peryodato, la etapa de eliminación comprende la eliminación de formas reducidas del agente oxidante (compuestos de yodo).

En un aspecto, la etapa de eliminar o minimizar los efectos de la oxidación de compuestos que contienen yodo puede comprender controlar el tiempo de exposición a cualquier agente oxidante entre la finalización de la etapa de oxidación y el inicio de la etapa de reducción.

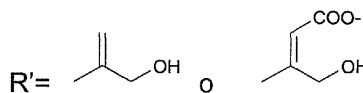
5 El procedimiento así descrito produce un enriquecimiento general de cadenas de polisacárido con distribución óptima de tamaño para asegurar un producto con las propiedades farmacológicas deseadas, propiedades adversas minimizadas, una alta biodisponibilidad y estabilidad de manipulación y almacenamiento. Por consiguiente, el procedimiento implica condiciones que garantizan la oxidación completa y también produce cadenas con una distribución de tamaños ventajosa que soporta una eficacia terapéutica deseable y se considera que mejora el índice terapéutico en comparación con otras heparinas anticoagulantes bajas (LAH) descritas. La invención, en términos generales, se extiende a derivados de glicosaminoglicanos preparados con los procedimientos citados.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a heparinas o sulfatos de heparano químicamente modificados con una actividad antifactor IIa de menos de 10 IU/mg, una actividad antifactor Xa de menos de 10 IU/mg y un peso molecular promedio (Mw) de aproximadamente 4,6 a aproximadamente 6,9 kDa. Tales derivados son posibles de producir con procedimientos de acuerdo con la invención. Las heparinas o los sulfatos de heparano químicamente modificados según la invención se caracterizan además porque:

- 20 - las cadenas de polisacáridos tienen de 2 a 20 (n en la fórmula I) unidades de disacáridos que corresponden a pesos moleculares entre 1,2 y 12 kDa;
- el disacárido predominantemente presente es (Fórmula I)



25 en el que



30 n es un número entero de 2 a 20

El disacárido predominante tiene un peso molecular de aproximadamente 600 Da. El término "predominantemente" en este contexto tiene el significado de las cadenas de polisacáridos "más frecuentemente presentes".

35 Además, en los glicosaminoglicanos modificados de acuerdo con el procedimiento divulgado anteriormente, las cadenas de polisacáridos retienen al menos 70 %, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 90 %, e incluso más preferiblemente esencialmente todos los grupos sulfato del glicosaminoglicano nativo correspondiente. Otro rasgo característico es que las cadenas de polisacáridos carecen esencialmente de secuencias de pentasacáridos químicamente intactas que median el efecto anticoagulante, en comparación con las cadenas del glicosaminoglicano nativo correspondiente.

45 Además, en los glicosaminoglicanos modificados de acuerdo con la invención, el tamaño predominante es 6-12 unidades de disacáridos que corresponden a pesos moleculares de 3,6-7,2 kDa. El término "predominantemente" tiene en este contexto el significado de las cadenas de polisacáridos "más frecuentemente presentes".

El glicosaminoglicano químicamente modificado está esencialmente libre de ácidos idurónico y/o glucurónico no sulfatados intactos. Esencialmente libre en este contexto significa que no es detectable en un espectro RMN ¹³C. Normalmente, el límite de detección se establece en 0,1 %.

50 También se prefiere que los glicosaminoglicanos modificados se deriven de heparina y que las cadenas estén esencialmente libres de ácidos idurónico no sulfatado y/o glucurónico no sulfatado, preferiblemente ácido D-glucurónico que da como resultado la eliminación de pentasacáridos químicamente intactos que median el efecto anticoagulante, en comparación con las cadenas de heparina nativa correspondiente.

55 Los glicosaminoglicanos químicamente modificados comprenden cadenas con extremos terminales reductores alternativos R' como se divulga en la Fig. 1. Los terminales no reductores son predominantemente GlcN, glucosaminas sulfatadas.

Los glicosaminoglicanos químicamente modificados tienen al menos 70 % de las cadenas de polisacáridos con un peso molecular superior a 3 kDa. También es adecuado que menos del 5 %, preferiblemente menos del 3 % y más preferiblemente menos del 1 % de las cadenas de polisacáridos tengan un peso molecular superior a 15 kDa.

5 Preferiblemente, las heparinas sulfatadas modificadas químicamente de la invención tienen pesos moleculares promedio que son estables durante al menos 36 meses a 5 °C como una solución acuosa regulada con fosfato, preferiblemente durante al menos 48 meses y más preferiblemente durante al menos 60 meses. El promedio de peso molecular permanece estable cuando se almacena como un polvo durante al menos 5 años a una temperatura de 25 °C. Detalles adicionales sobre las características de estabilidad se pueden encontrar en el ejemplo 2.

10 La presente invención también se refiere a glicosaminoglicanos químicamente modificados producidos con el procedimiento divulgado anteriormente.

15 La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas, útiles en el tratamiento de las mencionadas complicaciones y realizaciones terapéuticas preferidas, que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de los glicosaminoglicanos químicamente modificados descritos y un vehículo terapéuticamente aceptable. Tales composiciones se pueden administrar sistémicamente mediante administración parenteral, tal como mediante inyección subcutánea o intravenosa. Las composiciones farmacéuticas también se pueden suministrar por administración oral. Para la administración parenteral, los compuestos activos pueden incorporarse en una solución o suspensión, que también contiene uno o más adyuvantes tales como diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicol, glicerol, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos, antioxidantes, agentes quelantes, reguladores y agentes para ajustar la osmolalidad. La preparación parenteral se puede suministrar en ampollas, viales, jeringas desechables o como dispositivos de infusión, también para la autoadministración.

25 Los glicosaminoglicanos modificados de acuerdo con la invención están bien adaptados para administración subcutánea y por lo tanto con herramientas de autoadministración adecuadas, tales como inyectores, ya que tienen una distribución de pesos moleculares favorable para la resorción desde un depósito subcutáneo y de esta manera se parecen a las heparinas de bajo peso molecular comercialmente disponibles.

30 Además, debido a la distribución favorable de peso molecular, los glicosaminoglicanos modificados de acuerdo con la invención son adecuados para administración tópica, incluida la penetración de membranas mucosas tales como, pero sin limitarse a, administración vaginal, rectal, intrauterina y nasal. .

35 La presente invención también se refiere a glicosaminoglicanos químicamente modificados como se describió anteriormente para uso en tratamientos médicos que no dependen de un efecto anticoagulante.

También se describe aquí el uso de un glicosaminoglicano químicamente modificado de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para tratamientos médicos que no dependen de un efecto anticoagulante.

40 Ejemplos no limitantes de dichos tratamientos médicos son la prevención y el tratamiento del trabajo de parto prolongado (distocia) y la pérdida de proteínas en, por ejemplo, el síndrome de Gorham Stout. La pérdida de proteína de revestimientos endoteliales o epiteliales también se produce en trastornos como la sepsis y la enteropatía con pérdida de proteína. Los glicosaminoglicanos químicamente modificados de acuerdo con la invención se administran al paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

45 En un aspecto particular de la invención, se proporcionan los glicosaminoglicanos químicamente modificados de la invención, para uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en distocia y sepsis.

50 El LMWH así como heparina de baja anticoagulación aumentan la contractilidad miometrial inducida por oxitocina tanto *in vitro* como *in vivo* en mujeres embarazadas a término. La adición de LMWH o heparina de baja anticoagulación de acuerdo con la invención al cultivo de células cervicales a partir de biopsias cervicales humanas tomadas en el parto vaginal aumenta la síntesis de interleucina-6 y 8. Este hallazgo apoya LMWH y heparina de baja anticoagulación para inducir la maduración cervical. Por lo tanto, la LMWH y la heparina de baja anticoagulación tienen una acción inflamatoria en el cuello uterino en oposición a su efecto antiinflamatorio documentado en otros órganos. Por lo tanto, el GAG químicamente modificado de acuerdo con la invención se puede usar para la prevención y el tratamiento del trabajo de parto prolongado.

60 Se ha formulado la hipótesis de que la administración de heparina de baja anticoagulación a un paciente disminuirá la capacidad de las proteínas para pasar a través de la barrera celular y de ese modo tratar o prevenir la pérdida de proteínas de los revestimientos endoteliales o epiteliales. Además, se ha planteado la hipótesis de que la heparina de baja anticoagulación, tal como se definió anteriormente, se une a factores tales como citoquinas y factores de crecimiento (tal como VEGF) y de ese modo modula la actividad de estos factores. Otro factor de este tipo, la proteína de unión a heparina (HBP, azurocidina), está implicado en la pérdida endotelial y recientemente se sugirió que era el marcador principal de la sepsis temprana. Dado que los HBP parecen estar involucrados tanto en el proceso angiogénico patológico, por ejemplo en, el síndrome de Gorham Stout y en condiciones con vasos

65

permeables (HBP), y que la pérdida de sulfato de heparano puede conducir a la filtración de proteínas sobre el epitelio intestinal, se formuló la hipótesis de que el suministro de una heparina de baja anticoagulación de acuerdo con la invención junto con terapias más convencionales sería beneficioso y que la heparina ralentizaría el proceso. (Acta Pædiatrica 2011, 100, páginas 1448-1453). En resumen, el efecto *in vivo* de los glicosaminoglicanos químicamente modificados de acuerdo con la invención se deriva de una combinación de distribución adecuada de peso molecular y propiedades polianiónicas fuertes. El proceso de la invención se ha optimizado, ampliado y producido de acuerdo con GMP, lo que permite que el producto se administre a humanos.

La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Descripción detallada del proceso de fabricación de una heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención.

La sustancia se prepara a partir de heparina sódica. La preparación implica la oxidación selectiva de residuos de ácido urónico no sulfatados en heparina mediante peryodato, que incluye la fracción de ácido glucurónico en la secuencia de pentasacáridos que se une a AT. La ruptura de la estructura de este residuo aniquila la interacción de alta afinidad con AT y, en consecuencia, el efecto anticoagulante (medido como a-FXa o a-FIIa) se agota esencialmente. El tratamiento alcalino posterior, la reacción eliminación beta da como resultado la escisión del polímero en los sitios de ácidos urónicos no sulfatados que se han oxidado por el peryodato. En conjunto, estas manipulaciones conducen a una pérdida de la actividad anticoagulante junto con la despolimerización adecuada de la cadena de heparina.

Además, el extremo terminal reductor resultante en el sitio de escisión se reduce mediante NaBH_4 , que convierte el aldehído terminal en los dioles correspondientes que son más estables. Posteriormente, los aditivos, las impurezas y los productos secundarios se eliminan mediante precipitaciones repetidas con etanol, filtración y centrifugaciones. A continuación, la sustancia se obtiene en forma de polvo mediante secado con vacío y calor. La sustancia farmacológica se disolverá en un regulador acuoso estéril para producir el producto farmacológico, que está destinado a la administración intravenosa o subcutánea.

Los procesos descritos hasta ahora generalmente incluyen las etapas de oxidación, escisión del polímero (hidrólisis alcalina) y reducción. Los procesos de acuerdo con la presente invención se desarrollan con el fin de contrarrestar o eliminar cualquier tipo de despolimerización no específica de las cadenas de heparina. La polimerización no específica en este contexto significa generalmente tal despolimerización que no está relacionada con la reacción de eliminación beta alcalina específica. La despolimerización no específica da como resultado inestabilidades estructurales del producto que pueden dar como resultado una mayor despolimerización y decoloración durante el almacenamiento del producto purificado. Además, puede contribuir a la aparición de especies atípicas que aparecen en los espectros de RMN que normalmente no se encuentran en la heparina.

Los procesos descritos y ejemplificados en la siguiente sección incluyen diferentes aspectos de contrarrestar o eliminar la despolimerización no específica.

Ejemplo 1

Oxidación de ácido glucurónico e idurónico no sulfatado (residuos), eliminación del pentasacárido de unión a AT y actividad anticoagulante

Se disuelve una cantidad de aproximadamente 3.000 gramos de heparina en agua purificada para obtener una solución al 10-20 % p/v. El pH de esta solución se ajusta a 4,5-5,5. El metaperyodato de sodio (NaIO_4) se agrega posteriormente a la solución del proceso; cantidad de peryodato 15-25 % del peso de la heparina. El pH se ajusta nuevamente a 4,5-5,5. La reacción está protegida de la luz. La solución del proceso se hace reaccionar durante 18-24 horas con agitación constante manteniendo la temperatura a 13-17 °C, mientras que la temperatura se reduce a 5 °C durante las últimas dos horas.

Terminación de la reacción de oxidación y eliminación de compuestos que contienen yodo

Se agrega etanol (95-99,5 %) a la mezcla de reacción durante un período de 0,5-1 hora, con agitación cuidadosa y a una temperatura de 5-25 °C. El volumen de etanol que se agregará está en el intervalo de 1-2 volúmenes de etanol por volumen de solución de proceso. La heparina oxidada se deja precipitar y sedimentar durante 15-20 horas, después de lo cual el licor madre se decanta y se desecha.

A continuación, el sedimento se disuelve en agua purificada para obtener una solución de proceso al 15-30 % p/v. Se agrega NaCl para obtener una concentración de 0,15-0,30 mol/litro en la solución del proceso. La agitación continúa durante otra 0,5-1 hora mientras se mantiene la temperatura de 5-25 °C. Posteriormente se añaden 1,0-2,0

volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de solución de proceso a esta solución con agitación, durante un período de 0,5-1 hora. Esto precipita el producto de la solución.

Despolimerización de cadenas de polisacáridos mediante un proceso de eliminación beta alcalino

5 Después de decantar y desechar el licor madre, el sedimento se agita en aproximadamente 7 litros de agua hasta que se disuelve por completo, la concentración de la solución es ahora del 15-30 %. Mientras se mantiene la temperatura a 5-25 °C, se agrega lentamente una solución de NaOH 4 M hasta que se obtiene un pH de 10,5-12. La reacción se inicia y continúa durante 15-95 minutos. En este momento, se registra el pH de la solución y se agrega HCl 4 M lentamente hasta que se obtiene un pH de 5,5 - 7.

Reducción de extremos terminales reductores

15 Mientras se mantiene la temperatura a 13-17 °C, el pH de la solución se ajusta a 5,5-6,5. Luego se agrega a la solución una cantidad de 130-150 gramos de borohidruro de sodio mientras que el pH aumentará a 10-11, la reacción se continúa durante 14-20 horas. Después de este tiempo de reacción, se agrega lentamente un ácido diluido para ajustar el pH a un valor de 4, esto degrada el borohidruro de sodio restante. Después de mantener un pH de 4 durante 45-60 minutos, el pH de la solución se ajusta a 7 con una solución diluida de NaOH.

20 La purificación continúa de acuerdo con el ejemplo 5

Ejemplo 2

Oxidación del ácido glucurónico e idurónico (residuos), eliminación de la actividad anticoagulante

25 Se disuelve una cantidad de aproximadamente 3.000 gramos de heparina en agua purificada para obtener una solución al 10-20 % p/v. El pH de esta solución se ajusta a 4,5-5,5. El metaperyodato de sodio (NaIO₄) se agrega posteriormente a la solución del proceso; cantidad de peryodato 15-25 % del peso de heparina. El pH se ajusta nuevamente a 4,5-5,5. La reacción está protegida de la luz. La solución del proceso se hace reaccionar durante las 30 22- 26 horas con agitación constante y mantenimiento de la temperatura a 13-17 °C, mientras que la temperatura se reduce a 5 °C durante las últimas dos horas. El pH al final del período de reacción se mide y registra.

Terminación de la reacción de oxidación y eliminación de compuestos que contienen yodo

35 Se añadió etanol (95-99,5 %) a la mezcla de reacción durante un período de 0,5-1 hora, con agitación cuidadosa y a una temperatura de 5- 25 °C. El volumen de etanol que se agregará está en el intervalo de 1-2 volúmenes de etanol por volumen de solución de proceso. La heparina oxidada se deja precipitar y sedimentar durante 15-20 horas, después de lo cual el licor madre se decanta y se desecha.

Despolimerización de cadenas de polisacáridos mediante un proceso de eliminación beta alcalino

40 Después de decantar y desechar el licor madre, el sedimento se agita en aproximadamente 7 litros de agua hasta que parece visualmente que se disuelve completamente. Mientras se mantiene la temperatura a 20- 25 °C, se agrega NaOH 4 M lentamente hasta que se obtiene un pH de 10,5-12 y se permite que la reacción así iniciada 45 avance durante 15- 95 minutos. En este momento, se registra el pH de la solución y se agrega HCl 4 M lentamente hasta que se obtiene un pH de 5,5- 7.

Reducción de extremos terminales reductores

50 Después de decantar y desechar el licor madre, el sedimento se disuelve mediante la adición de agua purificada hasta que se obtiene una concentración de solución del proceso de 15-30 % p/v. Mientras se mantiene la temperatura a 13-17 °C, el pH de la solución se ajusta a 5,5-6,5. Después se agrega a la solución una cantidad de 130-150 gramos de borohidruro de sodio y se disuelve, el pH aumentará inmediatamente hasta un pH de 10-11, la reacción se continúa durante 14-20 horas. El pH de la solución, tanto antes como después de este período de 55 reacción, se registra. Después de este tiempo de reacción, se agrega lentamente un ácido diluido para ajustar el pH a un valor de 4, esto degrada el borohidruro de sodio restante. Después de mantener un pH de 4 durante 45-60 minutos, el pH de la solución se ajusta a 7 con una solución diluida de NaOH.

60 La purificación continúa de acuerdo con el Ejemplo 5.

Ejemplo 3

Oxidación del ácido glucurónico e idurónico (residuos), eliminación de la actividad anticoagulante

65 Se disuelve una cantidad de aproximadamente 3.000 gramos de heparina en agua purificada para obtener una solución al 10-20 % p/v. El pH de esta solución se ajusta a 4,5-5,5. El metaperyodato de sodio (NaIO₄) se agrega

posteriormente a la solución del proceso, cantidad de peryodato 15-25 % del peso de la heparina. El pH se ajusta nuevamente a 4,5-5,5. El reactor está protegido de la luz. La solución del proceso se hace reaccionar durante las 18-24 horas con agitación constante manteniendo la temperatura a 13-17 °C, mientras que la temperatura se reduce a 5 °C durante las últimas dos horas.

5

Despolimerización de cadenas de polisacáridos mediante un proceso de eliminación beta alcalino

Mientras se mantiene la temperatura a 5 - 25 °C, se agrega lentamente solución de NaOH 4 M hasta que se obtiene un pH de 10,5-12. La reacción se inicia y continúa durante 15- 95 minutos. En este momento, se registra el pH de la solución y se agrega HCl 4 M lentamente hasta que se obtiene un pH de 5,5-7.

10

Reducción de extremos terminales reductores

Mientras se mantiene la temperatura a 13-17 °C, el pH de la solución se ajusta a 5,5-6,5. Luego se agrega a la solución una cantidad de 130-200 gramos de borohidruro de sodio mientras que el pH aumentará a 10-11, la reacción se continúa durante 14-20 horas. Después de este tiempo de reacción, se agrega lentamente un ácido diluido para ajustar el pH a un valor de 4, esto degrada el borohidruro de sodio restante. Después de mantener un pH de 4 durante 45- 60 minutos, el pH de la solución se ajusta a 7 con una solución diluida de NaOH.

15

Precipitación de producto reducido y eliminación inicial de compuestos que contienen yodo

Se añade etanol (95-99,5 %) a la mezcla de reacción durante un período de 0,5-1 hora, con agitación cuidadosa y a una temperatura de 5-25 °C. El volumen de etanol que se agregará está en el intervalo de 1-2 volúmenes de etanol por volumen de solución de proceso. La heparina oxidada se deja precipitar y sedimentar durante 15-20 horas, después de lo cual el licor madre se decanta y se desecha.

25

A continuación, el sedimento se disuelve en agua purificada para obtener una solución de proceso al 15-30 % p/v. Se agrega NaCl para obtener una concentración de 0,15-0,30 mol/litro en la solución de proceso

30 La purificación continúa de acuerdo con el Ejemplo 5.

Ejemplo 4

Oxidación del ácido glucurónico e idurónico (residuos), eliminación de la actividad anticoagulante

Se disuelve una cantidad de aproximadamente 3.000 gramos de heparina en agua purificada para obtener una solución al 10-20 % p/v. El pH de esta solución se ajusta a 4,5-5,5. El metaperyodato de sodio (NaIO₄) se agrega posteriormente a la solución del proceso, cantidad de peryodato 15-25 % del peso de la heparina. El pH se ajusta nuevamente a 4,5-5,5. El reactor está protegido de la luz. La solución del proceso se hace reaccionar durante las 18-24 horas con agitación constante manteniendo la temperatura a 13-17 °C, mientras que la temperatura se reduce a 5 °C durante las últimas dos horas. A continuación, se agrega glicerol para inactivar la reacción, es decir, para convertir el peryodato residual en yodato, se añaden 150-200 mL de una solución de glicerol al 85 % y se hace reaccionar durante 30-60 minutos mientras se agita.

35

40

Precipitación de la remoción del producto de compuestos que contienen yodo y productos de inactivación/reacción

Se agrega etanol (95-99,5 %) a la mezcla de reacción durante un período de 0,5-1 hora, con agitación cuidadosa y a una temperatura de 5-25 °C. El volumen de etanol que se agregará está en el intervalo de 1-2 volúmenes de etanol por volumen de solución de proceso. La heparina oxidada se deja precipitar y sedimentar durante 15-20 horas, después de lo cual el licor madre se decanta y se desecha.

50

A continuación, el sedimento se disuelve en agua purificada para obtener una solución de proceso al 15-30 % p/v. Se agrega NaCl para obtener una concentración de 0,15-0,30 mol/litro en la solución del proceso. La agitación continúa durante otra 0,5-1 hora mientras se mantiene la temperatura de 5-25 °C. Posteriormente se añaden 1,0-2,0 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de solución de proceso a esta solución con agitación, durante un período de 0,5-1 hora. Esto precipita el producto de la solución.

55

Despolimerización de cadenas de polisacáridos mediante un proceso de eliminación beta alcalino

Después de decantar y desechar el licor madre, el sedimento se agita en aproximadamente 7 litros de agua hasta que parece visualmente que se disuelve por completo. Mientras se mantiene la temperatura a 5-25 °C, se agrega lentamente NaOH 4 M hasta que se obtiene un pH de 10,5-12 y se permite que la reacción así iniciada avance durante 60-95 minutos. En este momento, se registra el pH de la solución y se agrega HCl 4 M lentamente hasta que se obtiene un pH de 5,5-7.

60

65

Reducción de los extremos terminales reductores

Después de decantar y desechar el licor madre, el sedimento se disuelve mediante la adición de agua purificada hasta que se obtiene una concentración de solución de proceso de 15-30 % p/v. Mientras se mantiene la temperatura a 13-17 °C, el pH de la solución se ajusta a 5,5-6,5. Después se agrega a la solución una cantidad de 130-150 gramos de borohidruro de sodio y se disuelve, el pH aumentará inmediatamente hasta un pH de 10-11, la reacción se continúa durante 14-20 horas. El pH de la solución, tanto antes como después de este período de reacción, se registra. Después de este tiempo de reacción, se agrega lentamente un ácido diluido para ajustar el pH a un valor de 4, esto degrada el borohidruro de sodio restante. Después de mantener un pH de 4 durante 45-60 minutos, el pH de la solución se ajusta a 7 con una solución diluida de NaOH.

La purificación continúa de acuerdo con el Ejemplo 5.

Ejemplo 5

Purificación del producto

Eliminación de aditivos e impurezas del proceso, adición de contraiones y filtración

Las soluciones de proceso de acuerdo con los Ejemplos 1-4 que llegan de la etapa final de modificación química de la reducción de los extremos terminales por borohidruro se tratan de acuerdo con las metodologías descritas a continuación.

Se agrega un volumen de solución de proceso a 1,5-2,5 volúmenes de etanol (95-99,5 %) seguido de centrifugación a > 2000 G, a <20 °C durante 20-30 minutos, después de lo cual el sobrenadante se decanta y se descarta.

La pasta de producto obtenida por centrifugación se disuelve luego en agua purificada para obtener una concentración de producto de 10-20 % p/v. Luego se agrega NaCl para obtener una concentración de 0,20-0,35 mol/litro. Luego se agregan 1,5-2,5 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de solución de proceso que precipita el producto de la solución. La centrifugación sigue como se describió anteriormente.

A continuación, a la pasta restante se le agrega agua purificada hasta disolución. La concentración del producto estaría ahora en el intervalo de 10-20 % p/v. El pH de la solución del producto ahora se ajusta a 6,5-7,5. La solución se filtra para eliminar las partículas. Luego, a un volumen de solución de proceso se agregan 1,5-2,5 volúmenes de etanol (95-99,5 %). La centrifugación sigue a > 2000 G, y a <20 °C durante 20-30 minutos, después de lo cual el sobrenadante se decanta y descarta.

Deshidratación de la pasta del precipitado y reducción del tamaño de partícula.

Un reactor se llena con etanol, volumen de aproximadamente 2 litros. Mientras se agita el etanol, se agrega la pasta precipitada. La agitación mecánica solidifica la pasta y reemplaza el agua presente por el etanol produciendo una suspensión de partículas homogénea. La agitación se interrumpe después de 1-2 horas después de lo cual las partículas se dejan sedimentar. Después de eliminar el exceso de líquido, las partículas se pasan a través de un tamiz o un molino para obtener partículas de tamaño más pequeño y uniforme.

Secado de producto

El producto se distribuye uniformemente en bandejas, y se coloca en una cabina de vacío. Se aplica vacío y el calentamiento se realiza a 35-40 °C. Se pasa una corriente de nitrógeno a través del secador en este momento mientras se mantiene la presión baja en el secador. Cuando se obtiene un peso constante del producto, es decir, no se observa evaporación adicional, el secado se considera completo. El producto está empacado y protegido de la humedad.

Ejemplo 6

Oxidación del ácido glucurónico e idurónico (residuos), eliminación de la actividad anticoagulante

Se disuelve una cantidad de aproximadamente 3.000 gramos de heparina en agua purificada para obtener una solución al 10-20 % p/v. El pH de esta solución se ajusta a 4,5-5,5. El metaperyodato de sodio (NaIO₄) se agrega posteriormente a la solución del proceso, la cantidad de peryodato 15-25 % del peso de la heparina. El pH se ajusta nuevamente a 4,5-5,5. La reacción está protegida de la luz. La solución del proceso se hace reaccionar durante las 18-24 horas con agitación constante manteniendo la temperatura a 13-17 °C, mientras que la temperatura se reduce a 5 °C durante las últimas dos horas.

Despolimerización de cadenas de polisacáridos mediante un proceso de eliminación beta alcalino

Mientras se mantiene la temperatura a 5-25 °C, se agrega lentamente NaOH 4 M hasta que se obtiene un pH de 10,5-12 y se permite que la reacción así iniciada avance durante 15-95 minutos. En este momento, se registra el pH de la solución y se agrega HCl 4 M lentamente hasta que se obtiene un pH de 5,5-7.

5 Reducción de los extremos terminales reductores

Después de decantar y desechar el licor madre, el sedimento se disuelve mediante la adición de agua purificada hasta que se obtiene una concentración de la solución de proceso de 15-30 % p/v. Mientras se mantiene la temperatura a 13-17 °C, el pH de la solución se ajusta a 5,5-6,5. Después se agrega a la solución una cantidad de 10 130-200 gramos de borohidruro de sodio y se disuelve, el pH aumentará inmediatamente hasta un pH de 10-11, la reacción se continúa durante 14-20 horas. El pH de la solución, tanto antes como después de este período de reacción, se registra. Después de este tiempo de reacción, se agrega lentamente un ácido diluido para ajustar el pH a un valor de 4, esto degrada el borohidruro de sodio restante. Después de mantener un pH de 4 durante 45-60 minutos, el pH de la solución se ajusta a 7 con una solución diluida de NaOH. Ahora se agrega agua purificada a la 15 solución hasta que se obtenga una conductividad de 15-20 mS/cm de la solución de reacción.

Purificación del producto mediante cromatografía de intercambio aniónico

Una columna con un diámetro de 500 mm se empaca con medio, DEAE-Sefarosa o QAE-Sefarosa a un volumen de 20 25-30 litros que corresponde a una altura del lecho de 10-15 cm. La cromatografía se realiza en 3-4 ciclos para consumir todo el producto.

Se preparan los siguientes reguladores,

25 Regulador de equilibrio, Regulador A, fosfato 15 mM, NaCl 150 mM

Regulador de elución, Regulador B, solución de NaCl 2 M

30 Regulador de saneamiento, NaOH 0,5 M

La etapa de cromatografía se realiza a 15-25 °C, a una velocidad de flujo de ≤200 cm/hora o aprox. 350 litros/hora.

La columna se equilibra con el regulador de equilibrado hasta que el eluente tiene una conductividad de 15-20 mS/cm. A continuación, la solución de heparina oxidada se bombea a la columna. La cantidad de producto sin 35 purificar que se aplica corresponde a <40 g/litro de medio de cromatografía.

Sigue un lavado isocrático con regulador de equilibrio y se interrumpe cuando el intervalo de UV 210-254 nm ha alcanzado una línea base. Normalmente, se requieren 5 volúmenes de lecho de regulador para alcanzar la línea base. Los productos químicos agregados al proceso y los productos formados por estos se eliminan.

40 A continuación, la fuerza iónica del regulador aplicado sobre la columna aumenta linealmente al realizar una elución en gradiente. El regulador A disminuye de 100 % a 0 % reemplazado por 100 % de regulador B en 5 volúmenes de lecho. El eluato producto se recoge cuando la absorbancia de UV es > 0,1 AU y se interrumpe cuando la señal es <0,1 AU. Luego se realiza el saneamiento de la columna, después de lo cual se prepara nuevamente para el 45 siguiente ciclo de cromatografía. Los eluatos de todos los ciclos cromatográficos se combinan y almacenan a 15-25 °C.

Desalado del producto

50 A un volumen de los eluatos combinados de la etapa anterior se le añaden 3 volúmenes de etanol al 95-99,5 %, 15-25 °C, bajo agitación constante. Esto precipita el producto fuera de la solución. El producto se deja sedimentar por > 3 horas. A continuación, el sedimento se disuelve en agua purificada a una concentración de 15-25 %. La solución ahora se agrega al etanol frío (<-5 °C) 95-99,5 %, típicamente se consumen 5 volúmenes de etanol por un volumen de solución de producto. Después de la centrifugación en modo continuo, > 2.000 G, la pasta del producto se recoge 55 y se prepara para el secado.

Secado de producto

60 El producto se distribuye uniformemente en bandejas, y se coloca en una cabina de vacío. Se aplica vacío y el calentamiento se realiza a 35-40 °C. Una corriente de nitrógeno pasa a través del secador en este momento mientras se mantiene la presión baja en el secador. Cuando se obtiene un peso constante del producto, es decir, no se observa evaporación adicional, el secado se considera completo. El producto se muele y se hace homogéneo, luego se envasa y se protege de la humedad.

65 **Ejemplo 8**

La heparina de baja anticoagulación producida de acuerdo con los ejemplos 1 y 3 se sometió a análisis de RMN ¹H y se comparó con el espectro de heparina nativa.

La Tabla II demuestra que las señales en el intervalo de 5,00 ppm a 6,50 ppm no están presentes en la heparina nativa generada a partir de glucosaminas insaturadas en un extremo no reductor. Los resultados de la Tabla II muestran que es posible reducir la presencia de tales compuestos que no se predice que estarán presentes en el espectro de heparina nativa a niveles bajos. En comparación, el límite actual aplicable al control de calidad de heparina, monografía 7, EDQM es <4 % en comparación con la señal a 5,42 ppm para cualquier señal en la región de 5,70-8,00 ppm.

Tabla II. Resultados cualitativos de una heparina de baja anticoagulación con respecto a señales inusuales. Intensidad de la señal para las señales 6,15 y 5,95 ppm en un espectro de RMN ¹H

Muestra	Procedimiento de producción	Intensidad (relación en %) para una señal de 5,42 ppm de una heparina nativa después de EDQM, monografía 7	
		6,15 ppm % de la señal referencia	5,95 ppm % de la señal de referencia
Lote 1	Ejemplo 1	11	12
Lote 2	Ejemplo 1	13	16
Lote 3	Ejemplo 3	2	2

Además, la presencia de glucosaminas insaturadas en el extremo no reductor también se cuantificó por evaluación combinada de espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C (HSQC) y mostró el % en moles como glucosaminas totales (véase la Tabla III).

Además, se analizó la muestra de acuerdo con el procedimiento de bidimensional (2D) de RMN que implica el uso combinado de espectroscopía de RMN de protón y carbono (HSQC) como se describió previamente (véase Guerrini M., Naggi A., Guglieri S, Santarsiero). R, Torri G. Anal Biochem 2005; 337, 35-47.)

La Tabla III demuestra la fracción (%) de glucosaminas modificadas en comparación con la cantidad total de glucosaminas de la heparina de baja anticoagulación presente como señales a 5,95 ppm y 6,15 ppm en el espectro de RMN ¹H.

Tabla III: Resultados de la determinación cuantitativa de señales inusuales 5,95 ppm, 6,15 ppm de glucosamina total

Muestra	Procedimiento de producción	señal de 6,15 ppm en % mol de glucosamina	Señal de 5,95 ppm en % mol de glucosamina
Lote 1	Ejemplo 1	6	3
Lote 2	Ejemplo 3	<1	<1

Ejemplo 9

El producto fabricado de acuerdo con cualquiera de los ejemplos anteriores se puede preparar como producto farmacéutico mediante un proceso aséptico convencional, tal como una solución que comprende 150 mg/mL de producto activo y fosfato de Na a 15 mM, pH 6-8. El producto farmacéutico así obtenido está destinado principalmente a la administración subcutánea, pero es adecuado para la administración intravenosa.

El producto resultante es una forma despolimerizada de heparina con un peso molecular promedio proyectado de 4,6-6,9 kDa y esencialmente sin actividad anticoagulante.

El producto tiene una distribución de tamaños de polímeros de polisacáridos, con un intervalo para n de 2-20 que corresponde a pesos moleculares de 1,2 a 15 kDa. El tamaño predominante es 6-16 unidades de disacáridos que corresponden a pesos moleculares de 3,6-9,6 kDa.

El peso molecular se determinó por GPC-HPLC llevado a cabo con columnas TSK 2000 y TSK 3000 SW en serie. El índice de refracción se utilizó para la evaluación. Se utilizó el primer calibrador internacional para LMWH.

A continuación se presenta la distribución de masa molecular y la parte correspondiente del porcentaje acumulado del peso total.

Tabla IV. Distribución de polisacáridos y su masa molecular correspondiente en % acumulado de peso para varios lotes

Masa molecular, kDa	Peso acumulado, %
>15	<1
>10	4-15
>9	7-20
>8	10-27
>7	15-35
>6	22-45
>5	34-56
>4	47-70
>3	>70
>2	>85

El valor correspondiente para el peso molecular promedio ponderado, Mw cae en el intervalo de 4,6-6,9 kDa

5

Ejemplo 10

Se estudió la estabilidad de la sustancia farmacológica (polvo) y el producto del fármaco disuelto en una solución acuosa regulada con fosfato de un GAG químicamente modificado producido de acuerdo con el procedimiento de la invención. Los resultados se describen en la figura 2 y la figura 3.

10

Ejemplo 11

Administración subcutánea

15

Se administró heparina modificada químicamente marcada con tritio mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1 a ratas Sprague Dawley y perros.

Resultados:

20

Tras la administración subcutánea a 2, 8 y 24 mg de heparina/kg/día en la rata y 3, 15 y 45 mg de heparina/kg/día en el perro, la absorción fue rápida y los niveles en plasma máximos se alcanzaron generalmente en 0,5 y 1,5 h en la rata y el perro, respectivamente. La biodisponibilidad subcutánea fue de alrededor del 90 % tanto en la rata como en el perro. Curiosamente, la biodisponibilidad correspondiente para la heparina es de aproximadamente 10 %.

25

REIVINDICACIONES

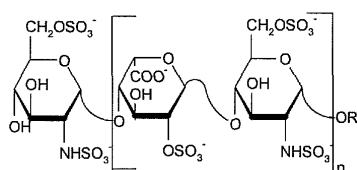
1. Un glicosaminoglicano químicamente modificado, cuyo glicosaminoglicano se selecciona del grupo que consiste en heparina y sulfato de heparano, y cuyo glicosaminoglicano químicamente modificado tiene:

(i) una actividad antifactor IIa de menos de 10 IU/mg;

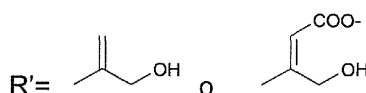
(ii) una actividad antifactor Xa de menos de 10 IU/mg; y

(iii) un peso molecular promedio ponderado (Mw) de 4,6 ($\pm 10\%$) a 6,9 ($\pm 10\%$) kDa; y en el que

(iv) el sacárido predominantemente presente del glicosaminoglicano químicamente modificado es de (Fórmula I):



en la que



n es un número entero de 2 a 20, de modo que las cadenas de polisacáridos tienen de 2 a 20 unidades de disacáridos que corresponden a pesos moleculares entre 1,2 y 12 kDa; y

(v) las cadenas de polisacáridos están esencialmente libres de ácidos idurónico y/o glucurónico no sulfatados químicamente intactos de las secuencias de pentasacáridos que median el efecto anticoagulante; y

(vi) los glicosaminoglicanos químicamente modificados tienen una distribución de polisacáridos y su correspondiente peso molecular expresado como % de peso acumulado de acuerdo con la tabla:

Peso molecular, kDa	Peso acumulado, %
>10	4-15
>8	10-25
>6	22-45
>3	>70

2. El glicosaminoglicano químicamente modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las cadenas de polisacáridos que se producen predominantemente tienen entre 6 y 12 unidades de disacáridos con pesos moleculares de 3,6-7,2 kDa.

3. El glicosaminoglicano químicamente modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende glucosaminas insaturadas terminales no reductoras presentadas como señales en el intervalo de 5,0 a 6,5 ppm en un espectro de RMN ¹H con una intensidad (relación en %) menor que 4 % en relación con la señal a 5,42 ppm de heparina nativa.

4. Los glicosaminoglicanos químicamente modificados de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las glucosaminas modificadas se presentan como señales a 5,95 ppm y 6,15 ppm en un espectro de RMN ¹H.

5. El glicosaminoglicano químicamente modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el glicosaminoglicano que se modifica es heparina.

6. Un procedimiento de preparación de un glicosaminoglicano sulfatado químicamente modificado seleccionado del grupo que consiste en heparina y sulfato de heparano con una actividad antifactor IIa de menos de 10 IU/mg, una actividad antifactor Xa de menos de 10 IU/mg y un peso molecular promedio ponderado (Mw) de 4,6 ($\pm 10\%$) a 6,9 ($\pm 10\%$) kDa, que comprende las etapas secuenciales de:

(a) oxidación de ácidos glucurónico e idurónico por tratamiento con peryodato,

(b) eliminación o minimización de los efectos de la oxidación de compuestos que contienen yodo

5 (c) despolimerización de cadenas de polisacáridos en condiciones alcalinas, y

(d) reducción y estabilización de grupos aldehído terminales a través de una reacción con un agente reductor,

10 en el que el tiempo que transcurrido entre el final de la etapa a) y el inicio de la etapa d) es de 1 ($\pm 10\%$) hora a 6 ($\pm 10\%$) horas.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la oxidación con peryodato se realiza:

15 (i) a una temperatura superior a 10 °C;

(ii) en una solución con una concentración de glicosaminoglicano inicial de 10 (± 1) % a 20 (± 2) % p/v;

(iii) durante al menos 15 horas; y/o

20 (iv) a una temperatura de 15 ± 2 °C, con una concentración de glicosaminoglicano de 15 ($\pm 1,5$) % y a pH 5 ($\pm 10\%$) durante 18 ($\pm 10\%$) horas a 24 ($\pm 10\%$) horas.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que la oxidación con peryodato se realiza durante 18 ($\pm 10\%$) horas a 24 ($\pm 10\%$) horas.

25 9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la despolimerización se realiza a una temperatura superior a 20 ($\pm 10\%$) °C.

30 10. Un glicosaminoglicano químicamente modificado que se puede obtener mediante un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que el glicosaminoglicano químicamente modificado está esencialmente libre de ácidos idurónico y/o glucurónico no sulfatados químicamente intactos de heparina nativa, y comprende una distribución de pesos moleculares de polisacáridos que se expresan como % de peso acumulado de acuerdo con la siguiente tabla:

35

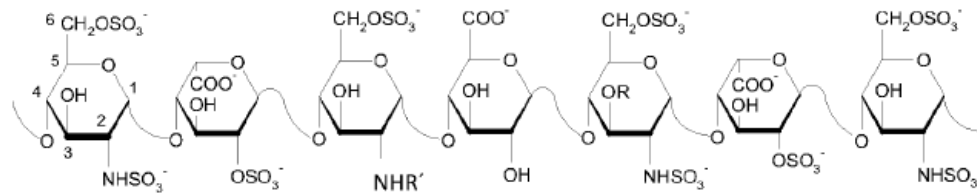
Peso molecular, kDa	Peso acumulado, %
>10	4-15
>8	10-25
>6	22-45
>3	>70

11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de glicosaminoglicanos sulfatados químicamente modificados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 10 y un vehículo terapéuticamente aceptable.

40

12. Un glicosaminoglicano químicamente modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 10 para su uso en el tratamiento y prevención de una afección seleccionada del grupo que consiste en distocia y sepsis.

Figura 1

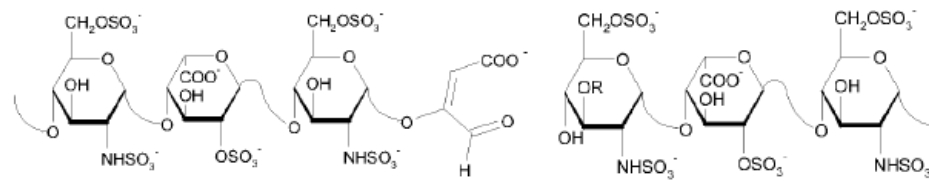


GlcN - UA - GlcN - UA - GlcN - UA - GlcN

R = -H or -SO₃⁻

R' = COCH₃ or -SO₃⁻

- ↓
 1) NaIO₄
 2) NaOH(aq)



- ↓ NaBH₄

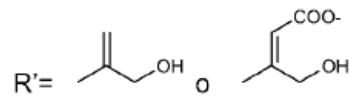
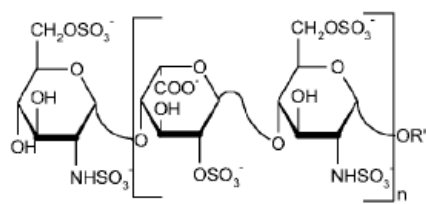


Figura 2

Resultados de estabilidad en la sustancia farmacológica durante 60 meses. Con base en los parámetros que indican la estabilidad seleccionada.

Prueba		Apariencia Visual	Absorbancia de color de una solución al 10%, 400 nm	Peso molecular promedio Mw, kDa	pH
Condiciones de almacenamiento:					
Temperatura (°C) / % RH	Tiempo (meses)				
25/60	Inicial	Polvo entre blanco y ligeramente amarillo	0,09	5,58.8	
	3	Cumple	0,10	5,7	8,9
	6	Cumple	0,11	5,5	8,6
	12	Cumple	0,10	5,5	8,8
	18	Cumple	0,10	5,5	8,4
	24	Cumple	0,10	5,5	8,7
	36	Cumple	0,11	5,5	8,4
	48	Cumple	0,12	5,5	8,1
	60	Cumple	0,11	5,5	8,3

Figura 3

Resultados de estabilidad en el Producto Farmacéutico durante 36 meses con base en los parámetros que indican la estabilidad seleccionada

Prueba	Apariencia	Color, absorbancia a 400 nm, solución al 10% p/v	pH	Osmolalidad mOsm/kg	Peso molecular promedio mkDa	Ensayo	
						Contenido Mg/mL	
Condición de almacenamiento:							
Temperatura [°C]	Tiempo [Meses]						
% RH	Inicial						
5/Ambiente	Solución blanco claro hasta ligeramente amarilla libre de partículas visibles	0,14	7,0	658	5,6	150	
	Cumple	0,10	7,0	658	5,6	155	
	Cumple	0,11	7,0	-		-	
	Cumple	0,12	7,1	637		147	
	Cumple	0,12	7,1	-		-	
	Cumple	0,13	7,0	648		156	
	Cumple	0,12	7,1	660		-	
Cumple	0,12	7,1	658		152		
Cumple	0,13	7,1	657		153		