(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 817 779**

(51) Int. CI.:

G01N 24/08 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C08B 37/10 (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)
G01R 33/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2011 PCT/US2011/021582**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11090948**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2011 E 11735052 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2526122**

(54) Título: **Evaluación de preparaciones de heparina**

(30) Prioridad:

19.01.2010 US 296218 P
25.05.2010 US 347950 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2021

(73) Titular/es:

MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
301 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

(72) Inventor/es:

BECCATI, DANIELA;
CAPILA, ISHAN;
GUNAY, NUR, SIBEL y
ROY, SUCHARITA

(74) Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

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

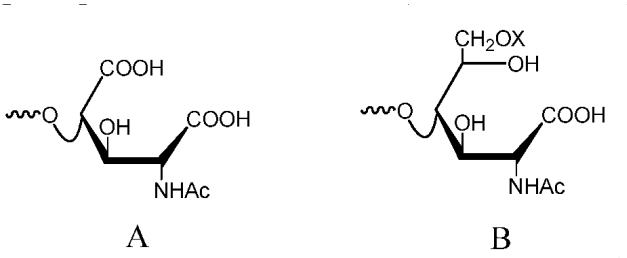
Evaluación de preparaciones de heparina

ANTECEDENTES

[0001] Los polisacáridos complejos se han utilizado como intervenciones farmacéuticas en una serie de procedimientos de la enfermedad, incluyendo oncología, enfermedades inflamatorias y trombosis. Los ejemplos de intervenciones farmacéuticas en esta clase son el ácido hialurónico, una ayuda para la cicatrización de heridas y el agente anticanceroso, y la heparina, un potente anticoagulante y agente antitrombótico. Los polisacáridos complejos provocan su función principalmente a través de la unión de moléculas de señalización de proteínas solubles, que incluyen factores de crecimiento, citocinas y morfogenos presentes en la superficie celular y dentro de las matrices extracelulares entre células, así como sus receptores cognados presentes dentro de este entorno. Al hacerlo, estos polisacáridos complejos efectúan cambios críticos en las vías de señalización extracelular e intracelular importantes para la función celular y tisular. Por ejemplo, la heparina se une al inhibidor de la coagulación antitrombina III promoviendo su capacidad para inhibir el factor IIa y Xa.

RESUMEN

[0002] La invención se refiere a un procedimiento para identificar si se utilizó un procedimiento que incluye oxidación u oxidación seguido de tratamiento con un ácido para elaborar una muestra de heparina, que comprende: determinar si una firma estructural está ausente o presente en la muestra de heparina y/o determinar la cantidad de la firma estructural en la muestra de heparina, donde la ausencia o presencia de la firma estructural se determina usando resonancia magnética nuclear (RMN), donde la presencia de la firma estructural y/o la presencia en una cantidad indica que la muestra de heparina fue elaborada mediante un procedimiento y la ausencia de la firma estructural indica que la muestra de heparina no fue elaborada mediante el procedimiento; y realizar una etapa con respecto a la muestra de heparina si la muestra de heparina se realizó mediante el procedimiento, donde la etapa es una o más de procesamiento en un producto farmacéutico, envío, formulación, etiquetado, empaquetado, comercialización, venta y oferta para la venta de la muestra de heparina; donde la firma estructural es una o más de:



donde en la estructura B, X = H o SO_3.

[0003] En una realización, la muestra de heparina es una muestra de heparina no fraccionada o una muestra de heparina de bajo peso molecular (HBPM). Preferentemente, la muestra de heparina es una muestra de HBPM.

[0004] En otra realización, la muestra de heparina es una muestra de heparina no fraccionada y el procedimiento incluye seleccionar la muestra de heparina no fraccionada para su procesamiento adicional para producir una muestra de HBPM.

[0005] En una realización, el procedimiento incluye además seleccionar la muestra de heparina y procesar la muestra de heparina para producir un producto farmacéutico.

[0006] En una realización, la muestra es una muestra de heparina no fraccionada y el procedimiento comprende además despolimerizar la muestra de heparina no fraccionada para producir una muestra de HPM.

[0007] En una realización, se determina la ausencia o presencia de la estructura A y la estructura B.

[0008] Los detalles de una o más realizaciones se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0009] Los dibujos se describen brevemente en primer lugar.

La figura 1 representa los espectros de RMN de protones ^{1}H 1D de una heparina sódica no fraccionada (región *N*-acetilo). La figura 1A representa los espectros de una muestra de heparina sódica no fraccionada con un estándar de sulfato de condrotina sobresulfatado enriquecido. La figura 1 B representa los espectros de la heparina sódica no fraccionada que no se enriqueció con el estándar. El pico marcado con un asterisco representa el pico a 2,10 ppm.

La figura 2 ilustra un espectro ^{1}H 1D-RMN expandido de una heparina sódica no fraccionada fabricada usando el procedimiento A (que no incluye una etapa de procesamiento oxidativo).

La figura 3 representa un espectro ^{1}H 1D-RMN expandido de una heparina sódica no fraccionada fabricada usando el procedimiento B (que incluye una etapa de procesamiento oxidativo) con la presencia de la señal a 2,10 ppm.

La figura 4 representa un espectro ^{1}H 1D-RMN expandido de una heparina sódica no fraccionada tratada con diferentes procedimientos de oxidación. La figura 4A representa los espectros de una heparina sódica no fraccionada tratada con peróxido de hidrógeno; la figura 4 B representa los espectros de una preparación de heparina no fraccionada tratada con permanganato de potasio.

La figura 5 representa un espectro 1H 1D-RMN expandido de intermedios de una preparación de HBPM antes y después del tratamiento con periodato de sodio. La figura 5A representa los espectros de una HBPM de partida, intermedio 1, que no se ha sometido a un procedimiento oxidativo. La figura 5B representa los espectros del intermedio 1, es decir, el intermedio 2, después de la oxidación con periodato de sodio.

La figura 6 ilustra un espectro ^{1}H 1D-RMN expandido de una preparación de heparán sulfato intestinal porcino antes y después del tratamiento con permanganato de potasio y un sulfato de heparina intestinal porcino enriquecido en residuos de N-acetilglucosamina de extremo reductor. La figura 6A representa los espectros de una preparación de heparán sulfato (HS) intestinal porcino. La figura 6B representa los espectros de la preparación de HS después de la oxidación con permanganato de potasio. La figura 6C representa los espectros de un sulfato de heparina intestinal porcina enriquecido en residuos de N-acetilglucosamina de extremo reductor (PI-HSNAc). La figura 6D ilustra los espectros del sulfato de heparina intestinal porcina enriquecido en residuos de N-acetilglucosamina de extremo reductor después de la oxidación con permanganato de potasio (PI-HSNAc$_{ox}$).

La figura 7 ilustra un espectro ^{1}H 1D-RMN expandido de una HBPM con alto porcentaje de GlcNAc en el extremo reductor de la cadena antes y después del tratamiento con permanganato de potasio. La figura 7A representa los espectros de la HBPM de partida. La figura 7B representa los espectros de HBPM después de la oxidación con permanganato de potasio. La señal a 2,10 ppm está marcada y se incrementa considerablemente en esta muestra.

La figura 8 representa espectros 2D-RMN (HSQC) de una preparación de heparán sulfato con un alto porcentaje de GlcNAc en el extremo reductor de la cadena antes y después del tratamiento con permanganato de potasio. La figura 8B representa los espectros 2D-RMN (HSQC) de una preparación de PI-HSNAc de partida. Las señales que surgen de la GlcNAc de extremo reductor están marcadas. La figura 8D ilustra los espectros 2D-RMN (HSQC) de la preparación de sulfato de heparina después de la oxidación con permanganato de potasio (PI-HSNAc$_{o}$).

La figura 9 representa un espectro ^{1}H 1D-RMN expandido de una preparación de heparina sometida a oxidación periodato y tratamiento ácido posterior.

La figura 10 representa un espectro 2D-RMN de PI-HSNAc$_{ox}$. La figura 10A es un espectro HSQC-DEPT de PI-HSNAc$_{ox}$. Los picos cruzados de CH se muestran en los recuadros. Se resalta el pico cruzado a 4,37/58,9 ppm. La figura 10B es un espectro HMBC de PI-HSNAc$_{ox}$. Se indica la correlación de largo alcance entre el protón 4,37 ppm y un grupo carbonilo.

La figura 11 representa un espectro 1D-RMN de PI-HSNAc$_{ox}$. La figura 11A representa los espectros 1D-RMN de PI-HSNAc$_{ox}$. La figura 11B representa los espectros de PI-HSNAc$_{ox}$ después del tratamiento con borodeuterido sódico y neutralización.

La figura 12 representa un espectro 2D-RMN de PI-HSNAc$_{ox}$. La figura 12 A representa los espectros HSQC-TOSCY de PI-HSNAc$_{ox}$ registrados con un tiempo de mezcla de 20 ms. La figura 12 A representa los espectros HSQC-TOSCY de PI-HSNAc$_{ox}$ registrados con un tiempo de mezcla de 90 ms.

La figura 13 representa un espectro HSQC de PI-HSNAc$_{ox}$. Las asignaciones de RMN para los residuos oxidados se indican cerca de los contornos relativos.

La figura 14 representa un espectro ESI-MS de iones negativos de las especies de tetrasacáridos oxidados que contienen cuatro sulfatos y un grupo acetilo (Dp4, S4, Ac1$_{ox}$). El inserto muestra los picos isotópicos bien resueltos del tetrasacárido oxidado.

La figura 15 representa un espectro 2D-RMN de una preparación de heparina no fraccionada. La figura 15A representa los espectros de una preparación de heparina no fraccionada que no se ha oxidado. La figura 15 B representa la preparación de heparina no fraccionada tratada con $KMnO_4$. La señal H1/C1 del extremo reductor de GlcNAc α desapareció, mientras que aparecieron señales en 4,37/58,9 y 3,88/81,8 (véase las señales circulares). También faltan señales debidas a la región de enlace (indicadas con * en A). La figura 16 representa un esquema de reacción que describe la formación de la estructura A (ácido N-acetilglucosamínico; donde X = H o SO3) generado como resultado de la oxidación con permanganato de potasio en el extremo reductor de las cadenas. Es posible que la oxidación adicional de la estructura A (si X=H) pueda resultar en la formación de un ácido dicarboxílico (estructura B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0010] La descripción se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que los picos dentro de la región *N*-acetilo de un espectro ^{1}H 1D-RMN de una preparación de heparina se asocian con firmas estructurales características que reflejan el procedimiento utilizado para elaborar la preparación de heparina. Por ejemplo, la presencia de un pico a 2,10 ppm en un espectro ^{1}H 1D-RMN de heparina no fraccionada representa una firma estructural característica que refleja una etapa de procesamiento oxidativo en la fabricación de heparina no fraccionada. Como otro ejemplo, una mayor cantidad de una firma estructural asociada con un pico a 2,08 ppm de un espectro ^{1}H 1D-RMN indica una preparación de heparina oxidada que se ha sometido a tratamiento ácido. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un procedimiento descrito en esta invención puede incluir evaluar la ausencia, presencia o cantidad de una firma estructural asociada con un pico en la región *N*-acetilo de un espectro ^{1}H 1D-RMN de una preparación de heparina. La región *N*-acetilo se refiere a una región de aproximadamente 1,8 ppm a 2,20 ppm, por ejemplo, 1,9 ppm a 2,15 ppm, 2,0 ppm a 2,12 ppm, 2,02 ppm a 2,10 ppm de un espectro ^{1}H 1D-RMN. Presencia significa si se puede detectar una firma estructural. Cantidad se refiere a la cantidad, por ejemplo, como % en peso o número.

[0011] En algunas realizaciones, se puede utilizar un procedimiento descrito en esta invención para determinar si una preparación de heparina (por ejemplo, una preparación de heparina no fraccionada o una preparación de heparina de bajo peso molecular (HBPM)) está en riesgo de coloración. Algunas preparaciones de heparina tienen una vida útil limitada debido, al menos en parte, al desarrollo de color en la preparación durante el almacenamiento. La expresión coloración significa más de 0,2 unidades de absorbancia en una prueba de estabilidad acelerada tal como el análisis calorimétrico descrito en la publicación de los EE. UU. n .º: 20080318328.

[0012] Como se usa en esta invención, "adquirir un valor" se refiere a cualquier procedimiento que resulte en la posesión del valor. En una realización, adquirir un valor comprende someter una muestra a un procedimiento que resulta en un cambio físico en la muestra u otra sustancia, por ejemplo, un reactivo analítico o un dispositivo utilizado en el análisis. Dichos procedimientos comprenden procedimientos analíticos, por ejemplo, un procedimiento que incluye uno o más de los siguientes: separar una sustancia, por ejemplo, un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, de otra sustancia; combinar un analito, o fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, por ejemplo, un tampón, disolvente o reactivo; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento de otro derivado del mismo, por ejemplo, rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito. Los procedimientos analíticos típicos incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), resonancia magnética nuclear (RMN), electroforesis capilar (CE) y espectroscopia de masas (por ejemplo, espectroscopia de masas-ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS), espectroscopia de masas-ionización por electropulverización (ESI-MS)) y cromatografía líquida de proteínas rápidas (FPLC).

[0013] En una realización, una parte que practica el procedimiento realiza el procedimiento. Como se usa en esta invención, "adquirir directamente" se refiere a un procedimiento en el que la parte que practica el procedimiento realiza el procedimiento. En una realización, una parte que practica el procedimiento recibe el valor de otra parte. Como se usa en esta invención, "adquirir indirectamente" se refiere a un procedimiento en el que la parte que practica el procedimiento recibe el valor de otra parte. Típicamente, incluso en realizaciones caracterizadas por adquisición indirecta, alguna parte ha sometido una muestra a un procedimiento como se describió anteriormente que resulta en un cambio físico en la muestra u otra sustancia. En una realización, una parte que practica el procedimiento de evaluación instruye a otra parte para que realice el procedimiento y, por ejemplo, una parte que practica el procedimiento recibe el valor.

Preparaciones de heparina

[0014] Una preparación de heparina, como se usa en esta invención, es una preparación que contiene heparina o una preparación derivada de la misma y, por lo tanto, incluye heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular (HBPM), heparina de ultra bajo peso molecular (HUBPM) y similares.

[0015] El término "heparina no fraccionada (HNF)", como se usa en esta invención, es heparina purificada de la mucosa intestinal porcina. La HNF se puede usar, por ejemplo, como material de partida en el procedimiento para formar una HBPM. La heparina no fraccionada está disponible comercialmente en varios proveedores, incluyendo Abbott, Organon, Riker, Invenex, Baxter, Calbiochem, Sigma o Upjohn. En algunas realizaciones, la heparina se elabora mediante un procedimiento que incluye una etapa de oxidación. La etapa de oxidación puede incluir el uso de al menos uno de: un peróxido de sal de permanganato, periodato, cloro, dióxido de cloro y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la sal de permanganato puede ser uno o más de permanganato de potasio, permanganato de sodio, permanganato de amonio cuaternario, peróxido de hidrógeno. Preferentemente, la etapa de oxidación incluye usar una sal de permanganato. En algunas realizaciones, la heparina se produce mediante un procedimiento que incluye una etapa de reducción, por ejemplo, tal como tratamiento con borohidruro de sodio, hidruro de litio y aluminio o combinaciones de los mismos.

[0016] La preparación de heparina también puede ser una preparación de HBPM. Los ejemplos de preparaciones de HBPM incluyen, pero no se limitan a, una preparación de enoxaparina (Lovenox™ o Clexane™); una preparación de dalteparina (Fragmin™); una preparación de certoparina (Sandoparin™ o Embollex); una preparación de ardeparina (Normiflo™); una preparación de nadroparina (Fraxiparin™); una preparación de

parnaparina (Fluxum™); una preparación de reviparina (Clivarin™); una preparación de tinzaparina (Innohep™ o Logiparina™), una preparación de fondaparinux (Arixtra™) o una preparación de M118-REH. En algunas realizaciones, la preparación de HBPM puede ser una preparación de HBPM realizada por uno o más de los siguientes procedimientos: fraccionamiento usando disolventes (patente francesa n .º: 2.440.376, patente de los EE. UU. n.º: 4.692.435); fraccionamiento usando una resina aniónica (patente francesa n.º: 2.453.875); filtración en gel (Barrowcliffe (1977) Thromb. Res. 12:27-36); cromatografía de afinidad (patente de los EE. UU. n .º: 4.401.758); despolimerización controlada por medio de un agente químico que incluye, pero no se limita a, ácido nitroso (patente europea n.º.: 014 184 B1, patente europea n .º: 037 319 B1, patente europea n .º: 076 279 B1, patente europea n .º: 623 629 B1, patente francesa n.º: 2.503.714, patente de los EE. UU. n .º 4.804.652 y publicación PCT n .º: WO 81/03276), beta-eliminación a partir de un éster de heparina (patente europea n.º: 040 144 B1, patente de los EE. UU. n .º: 5.389.618), periodato (documento EP 287477), borohidruro de sodio (documento EP 347588, EP 380943), ácido ascórbico (patente de los EE. UU. n .º: 4.533.549), peróxido de hidrógeno (patente de los EE. UU. n.º: 4.629.699, patente de los EE. UU. n.º: 4.791.195), hidróxido de amonio cuaternario a partir de una sal de amonio cuaternario de heparina (patente de los EE. UU. n .º: 4.981.955), hidróxido de metales alcalinos (patente europea n.º: 380 943, patente europea n .º: 347 588), por vía enzimática (patente europea n.º: 064 452, patente de los EE. UU. n.º: 4.396.762, patente europea n.º: 244 235, patente europea n .º: 244. 236; patente de los EE. UU. n.º: 4.826.827; patente de los EE. UU. n.º: 3.766.167), por irradiación (patente europea n.º: 269 981), y otros procedimientos o combinaciones de procedimientos tales como los descritos en la patente de los EE. UU. n .º: 4.303.651, la patente de los EE. UU. n.º: 4.757.057, la publicación de los EE. UU. n.º: 2007/287683, la publicación PCT n.º: WO 2009/059284 y la publicación PCT n.º: WO 2009/059283.

[0017] En algunas realizaciones, una preparación de heparina, por ejemplo, una preparación de heparina no fraccionada, puede seleccionarse para su procesamiento adicional en función de la ausencia, presencia o cantidad de una firma estructural que indica el procedimiento utilizado para elaborar la preparación de heparina. Por ejemplo, una preparación de heparina no fraccionada puede seleccionarse para su procesamiento adicional, por ejemplo, en una preparación de HBPM. La preparación de heparina no fraccionada se puede seleccionar para su procesamiento adicional, por ejemplo, mediante uno o más de los procedimientos descritos anteriormente.

Base de datos

[0018] La descripción también presenta una base de datos que correlaciona la presencia o cantidad de una firma estructural asociada con un pico en la región *N*-acetilo de un espectro ^{1}H 1D-RMN, por ejemplo, un pico a 2,08 ppm de la figura 9 y/o el pico a 2,10 ppm de la figura 1, con un procedimiento utilizado para elaborar la preparación de heparina (por ejemplo, un procedimiento que incluye oxidación u oxidación seguida de tratamiento con un ácido), y el uso de dicha base de datos, por ejemplo, en un procedimiento descrito en esta invención. El término "base de datos" se refiere a una recopilación de datos. Típicamente, se organiza de manera que sus contenidos puedan ser fácilmente accesibles, gestionados y actualizados. En una realización, la base de datos está configurada o gestionada para garantizar su integridad y calidad, para minimizar el contenido más allá de los registros descritos en esta invención y para permitir el acceso controlado. La base de datos se presenta o se memoriza en un medio. El medio puede ser, por ejemplo, un medio de papel tradicional u otro medio que muestre símbolos impresos o escritos que pueden ser utilizados directamente (por ejemplo, sin la ayuda de un ordenador) por un ser humano. Dicha base de datos puede existir como un conjunto de tablas impresas, o un catálogo de tarjetas, que, por ejemplo, muestran la relación de la firma estructural con el procedimiento utilizado para producir la preparación de heparina. La base de datos también se puede presentar o memorizar en formato electrónico u otro formato legible por ordenador. Estas realizaciones pueden variar desde hojas de cálculo simples a realizaciones más complejas. No es necesario depositar la base de datos en una sola unidad de medio, por ejemplo, en una sola tabla o libro, o en un solo ordenador o red. Una base de datos, por ejemplo, puede combinar un medio tradicional como se describió anteriormente con un medio legible por ordenador. Típicamente, la base de datos contendrá una colección de registros, donde cada registro relaciona una firma estructural con un procedimiento de fabricación por medio de una función correlativa. La base de datos se puede organizar de varias maneras, por ejemplo, como una base de datos relacional. Típicamente, la base de datos está en un formato en el que se puede buscar información o registros específicos mediante técnicas específicas para cada base de datos. Una base de datos informática es típicamente una colección estructurada de registros almacenados en un ordenador u ordenadores para que un programa pueda consultarla para responder consultas.

Valores y estándares de referencia

[0019] Un estándar de referencia, a modo de ejemplo, puede ser un valor determinado a partir de una preparación de heparina de referencia (por ejemplo, una preparación de heparina comercialmente disponible o una preparación de heparina elaborada mediante un procedimiento particular). Por ejemplo, un estándar de referencia puede ser un valor para la presencia de una firma estructural en una preparación, por ejemplo, una preparación de heparina de referencia. El estándar de referencia puede ser numérico o no numérico, por ejemplo, puede ser un valor cualitativo, por ejemplo, sí o no, o presente o no presente en un nivel preseleccionado de detección, o gráfico o pictórico. El estándar de referencia también puede ser valores para la presencia de más de una firma estructural en una muestra. Por ejemplo, el estándar de referencia puede ser un mapa de estructuras (por ejemplo, estructuras asociadas con picos en la región *N*-acetilo de espectros ^{1}H-1D-RMN) presentes en una preparación de heparina

cuando se analizan mediante un procedimiento de separación descrito en esta invención. El estándar de referencia también puede ser un estándar de liberación (un estándar de liberación es un estándar que debe cumplirse para permitir la venta comercial de un producto) o estándar de producción, por ejemplo, un estándar que es impuesto, por ejemplo, por una parte, por ejemplo, la FDA, a una heparina o HBPM.

Detección de firmas estructurales

[0020] La ausencia, presencia o cantidad de una firma estructural asociada con un pico en la región *N*-acetilo de un espectro ^{1}H 1D-RMN se puede determinar por resonancia magnética nuclear (RMN).

[0021] En una realización, la ausencia, presencia o cantidad de una firma estructural se determina usando 1D-RMN o 2D-RMN. La 2D-RMN se puede llevar a cabo utilizando espectroscopia homonuclear (por ejemplo, COSY, TOCSY, NOESY y ROESY) y/o heteronuclear (por ejemplo, HSQC, HSQC-DEPT, HMQC-COSY, HSQC-TOSCY y HMBC). Los picos representados en muchas de las figuras se obtuvieron usando 1H 1D-RMN. El procedimiento general para la ^{1}H 1D-RMN fue el siguiente: una muestra de heparina no fraccionada (aproximadamente 20 mg) se disolvió en 0,7 ml de D_2O (óxido de deuterio, 99,96 % átomo D) y se transfirió a un tubo de RMN de 5 mm. Los espectros de protones (^{1}H) 1D-RMN se adquirieron en un espectrómetro Varian VNMRS de 600 MHz equipado con una sonda de resonancia triple de 5 mm. Los datos se adquirieron a 25 °C, con presaturación de la señal de agua, para 16-32 exploraciones y un retraso de 10 segundos. El espectro de RMN se recogió con una ventana espectral de 14 a -2 ppm. Las muestras se calibraron utilizando un estándar interno añadido (0,1 % p/v TSP; protones de metilo establecidos en 0,00 ppm), o mediante el ajuste de la señal principal de protones *de N*-acetil metilo de heparina a 2,045 ppm.

[0022] Los experimentos iniciales realizados confirmaron que un pico a 2,10 ppm no es sulfato de condrotina sobresulfatado (OSCS), un contaminante que a veces se encuentra en la heparina. Los resultados indicaron que el OSCS muestra un pico principal diferenciado a 2,15 ppm que se resuelve bien desde el pico a 2,10 ppm (figura 1).

[0023] La RMN también se utilizó para analizar preparaciones de heparina no fraccionada obtenidas de diferentes fuentes para comprender el origen potencial del pico a 2,10 ppm. La figura 2 muestra una preparación de heparina no fraccionada realizada por el procedimiento A y que no contiene la señal a 2,10 ppm, mientras que la figura 3 muestra una preparación de heparina no fraccionada realizada por un procedimiento diferente, el procedimiento B, y que contiene la señal a 2,10 ppm. Esto indica que las diferentes condiciones de procesamiento pueden tener un efecto en la observación del pico a 2,10 ppm. La preparación de heparina no fraccionada analizada en la figura 3 se sometió a una etapa de procesamiento oxidativo (procedimiento B), mientras que la preparación de heparina no fraccionada analizada en la figura 2 no se sometió a una etapa de procesamiento oxidativo (procedimiento A). Por lo tanto, el pico a 2,10 ppm observado en la ^{1}H 1D-RMN de heparina no fraccionada surge debido a los procedimientos oxidativos a los que se ha sometido a la heparina durante la fabricación. Este procesamiento oxidativo modifica el entorno químico alrededor del residuo *de N*-acetilglucosamina, dando lugar así al pico a 2,10 ppm.

[0024] Con base en estas observaciones iniciales, se evaluó una preparación de heparina de bajo peso molecular (HBPM) que había sido sometida a un procedimiento oxidativo. Los datos de ^{1}H 1D-RMN obtenidos en intermedios de un procedimiento utilizado para elaborar una preparación de HBPM indicaron que la oxidación con periodato de sodio produjo una preparación de HBPM que muestra la aparición de señales en la región de 2,10 ppm. En la figura 5, el panel superior muestra la muestra de HBPM de partida (intermedio 1 que no ha sido sometida a oxidación y que no tiene una señal detectable a 2,10 ppm. Este intermedio de HBPM se sometió a oxidación con periodato de sodio. Después de la oxidación, la preparación de HBPM resultante, (intermedio 2; panel inferior de la figura 5), mostró la presencia de señales a 2,09 y 2,10 ppm. Es probable que la presencia de estas señales se deba a un cambio en el entorno de los grupos *N*-acetilo presentes en los residuos de glucosamina adyacentes a los residuos de ácido urónico en heparina que se han oxidado como resultado del tratamiento con periodato. También vale la pena señalar que agentes como el permanganato siguen mecanismos similares de oxidación, y el permanganato se utiliza comúnmente en los procedimientos de oxidación de heparina durante la purificación.

[0025] Se realizaron experimentos adicionales para determinar si se produjo una modificación en o cerca del residuo *de N*-acetilglucosamina (GlcNAc) cuando el residuo estaba presente internamente dentro de la cadena, o en el extremo reductor de la cadena. Para probar esto, una preparación de heparán sulfato intestinal porcino con una alta cantidad de cadenas que tienen una GlcNAc interna (PI-HS) se sometió a oxidación con permanganato de potasio (PI-HS_{ox}). En conjunto, se preparó una muestra de heparán sulfato intestinal porcino enriquecido en residuos de N-acetilglucosamina de extremo reductor (PI-HSNAc) y se sometió a la misma oxidación con permanganato de potasio (PI-$HSNAc_{ox}$) que el sulfato de heparina intestinal porcino.

[0026] Además, una preparación de heparina de bajo peso molecular preparada por digestión enzimática que tiene un alto porcentaje de GlcNAc en los extremos reductores de las cadenas en la muestra se sometió a oxidación con permanganato. Ambas preparaciones se sometieron a las mismas condiciones de oxidación.

[0027] Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 6 y 7. La oxidación de la preparación

de heparán sulfato con permanganato dio como resultado un aumento muy pequeño del pico a 2,10 ppm (figura 6B). En contraste, la preparación de sulfato de heparina enriquecida en N-acetilglucosamina de extremo reductor se oxidó, hubo una señal intensa a 2,10 ppm (figura 6D), lo que indica que la química oxidativa tuvo una influencia significativa en los residuos de N-acetilglucosamina en la posición de extremo reductor de la cadena de heparina. Además, cuando la preparación de HBPM que tiene un alto porcentaje de GlcNAc en el extremo reductor se oxidó, hubo un aumento dramático en el pico a 2,10 ppm (figura 7). Estos resultados sugieren que la estructura que resulta en el pico a 2,10 ppm surge de N-acetilglucosamina en o cerca del extremo reductor de la cadena.

[0028] Estos experimentos demuestran que las señales en la región *N*-acetilo de los espectros ^{1}H 1D-RMN de heparinas no fraccionadas pueden ser indicativas de diferentes etapas de procesamiento emprendidas durante la fabricación de heparina.

[0029] La presencia de residuos reductores de α y β N-acetilglucosamina en PI-HSNAc y PI-HSNAc$_{ox}$ se confirmó mediante experimentos multidimensionales, es decir, COSY, TOCSY y HSQC. Los espectros HSQC mostraron que después de la oxidación, las señales que surgen de GlcNAc en el extremo reductor ya no se observan (figura 8). La comparación entre los espectros HSQC de PI-HSNAc (figura 8B) y PI-HSNAc$_{ox}$ (figura 8D) demuestra que las señales debidas a las señales anoméricas reductoras α y β de los residuos de N-acetilglucosamina de extremo reductor desaparecieron después del tratamiento con permanganato de potasio, mientras que los picos debidos a la N-acetilglucosamina interna (5,4-5,3/100,3-98,8 ppm) no aumentaron en intensidad.

[0030] Simultáneamente, dos picos cruzados distintos aparecen a 4,37/58,9 ppm y 3,88/81,8 ppm (figura 8C) después de la oxidación con permanganato de potasio. Un experimento HSQC-DEPT asignó el pico a 4,37/58,9 ppm a un residuo -CH (figura 10A). Un experimento COSY registrado en agua deuterada al 10 % mostró un pico cruzado entre un protón amida (del grupo *N*-acetilo) a 7,99 ppm y el pico a 4,37 ppm, mientras que un experimento NOESY adquirido en agua deuterada al 10 % correlacionó el protón amida a 7,99 ppm con la señal de CH_3 a 2,10 ppm. Estos datos sugieren que el pico a 4,37 ppm surge debido al H2 del residuo *N*-acetilglucosamina oxidado. Además, el análisis de HMBC mostró una correlación de largo alcance entre el protón a 4,37/58,9 ppm y un grupo carbonilo (figura 10B). Para determinar si el grupo carbonilo pertenecía a un resto aldehídico o carboxílico, se realizaron dos experimentos. En primer lugar, la muestra se acidificó a pH 4,1 y se registró un experimento de HSQC. El experimento mostró que el pico cruzado a 4,37/58,9 ppm cambió a 4,47/58,3 ppm en función del pH de la solución, consistente con un grupo CH adyacente a un resto de ácido carboxílico. Además, se trató PI-HSNAcox con borodeuterido sódico (10 % p/p) durante 60 minutos a 4 °C y, después de la neutralización, se analizó mediante 1HRMN (figura 11). La intensidad de la señal a 2,10 ppm no disminuyó después de la reducción, lo que indica que el grupo metilo del residuo *N*-acetilglucosamina oxidado es adyacente a un grupo ácido carboxílico. Además, los experimentos COSY y TOCSY no muestran ninguna correlación de este pico (4,37 ppm) con las señales presentes en la región anomérica, lo que indica que C1 no tiene un protón correspondiente. Esta observación respalda la asignación del C1 como un resto de ácido carboxílico.

[0031] Los experimentos HSQC-TOCSY muestran correlaciones adicionales entre el pico a 4,37/58,9 ppm y las señales a 4,21/73,6 ppm, 3,88/81,8 ppm y 4,12/72,8 ppm (figura 12). La asignación de estos picos cruzados se realizó mediante el análisis de experimentos HMQC-COSY y HSQC-TOCSY registrados con diferentes tiempos de mezcla, y se presentan en la tabla 1 a continuación y en la figura 13. También se observaron picos cruzados adicionales a 3,80/64,4 ppm y 3,72/64,4 ppm en los espectros de HSQC de todas las muestras tratadas con permanganato de potasio. Los espectros HSQC-DEPT indican que estas señales surgen de restos CH_2 (figura 10A). Las correlaciones entre los picos a 3,80 y 3,72 ppm y otros protones del residuo oxidado no pudieron identificarse claramente mediante experimentos COSY y TOCSY debido a la superposición grave con otras señales de heparina. Sin embargo, la proximidad de los picos de HSQC a 3,80/64,4 ppm y 3,72/64,4 ppm a la H6,6'/C6 de residuos *de N*-acetilglucosamina 6-O-desulfatada, y la aparición de estas señales tras el tratamiento con permanganato de potasio, sugiere la asignación de estos picos a H6,6'/C6 de ácido *N*-acetilglucosamínico 6-O-desulfatado. Las asignaciones de desplazamiento químico del residuo generado por el tratamiento con permanganato de potasio son consistentes con un ácido *N*-acetilglucosamínico 4 sustituido (Uchiyama y col. (1990) J. Biol. Chem., 265 7753-7759).

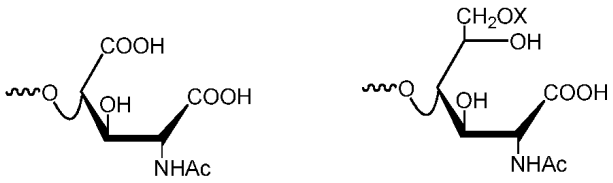
Tabla 1. Asignación de RMN del extremo reductor oxidado (ácido *N*-acetilglucosamínico) Heparina/Heparán sulfato

	Heparina/Heparán sulfato	
	^{1}H	13C
C1	-	178,8
H2/C2	4,37	58,9
H3/C3	4,21	73,6
H4/C4	3,88	81,8
H5/C5	4,12	72,8

(continuación)

	Heparina/Heparán sulfato	
	^{1}H	13C
H6,H6'/C6	3,80, 3,72*	64,4*
*Estos cambios químicos corresponden al residuo que no está sulfatado en la posición 6-O		

[0032] Con base en estos resultados, se han determinado dos posibles estructuras que pueden dar lugar al pico a 2,10 ppm. Las estructuras son:



A B

donde, en la estructura B, X = H o SO_3.

[0033] La espectrometría de masas se aplicó como una técnica analítica ortogonal para respaldar la asignación estructural. Se espera que la diferencia de masa entre *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilglucosamínico en el extremo reductor sea +16 Da. La muestra de PI-HSNAcox se digirió con heparinasa I y se analizó mediante cromatografía de permeación en gel, seguida de espectrometría de masas.

[0034] Los resultados mostraron que algunas especies acetiladas tienen 16 Da más masa que las especies *de N*-acetilglucosamina no oxidadas correspondientes (figura complementaria 5). Esta observación corrobora adicionalmente la reivindicación de los investigadores de un resto -COOH oxidado presente en el C1 de la *N*-acetilglucosamina de extremo reductor.

[0035] Finalmente, para confirmar si las observaciones de los investigadores sobre el compuesto modelo (PI-HSNAc) podían extenderse a la heparina no fraccionada, el lote 2 de HNF se sometió a oxidación con permanganato de potasio. En las muestras de heparina no fraccionada, la cantidad de *N*-acetilglucosamina en el extremo reductor es generalmente muy baja (por debajo del 1 % del contenido total de glucosamina, según lo estimado por RMN). Por lo tanto, los experimentos de HSQC de heparina adquiridos con un número suficiente de exploraciones permiten la detección de un pico pequeño a 5,20/93,4 ppm que pertenece a *N*-acetilglucosamina reductora α (figura 6A). La oxidación con permanganato de potasio del lote 2 de HNF causó la desaparición de la señal de *N*-acetilglucosamina reductora α y la aparición de picos cruzados a 4,37/58,9 ppm y 3,88/81,8 ppm (figura 15). Este resultado demuestra que, al igual que la situación de PI-HSNAc, la oxidación de heparina no fraccionada con permanganato de potasio resulta en la formación de un residuo de ácido *N*-acetilglucosamínico en el extremo reductor de la cadena.

[0036] También se llevaron a cabo experimentos para mostrar que ciertos picos en la región *N*-acetilo pueden resultar de diferentes etapas de procesamiento químico de heparina. Por ejemplo, la heparina oxidada periodato se sometió a tratamiento ácido. El tratamiento en una preparación de heparina oxidada con un ácido dio como resultado un aumento de un pico a 2,08 ppm (figura 9). También se observaron algunos picos menores en la región de 2,10 ppm.

[0037] Estos experimentos descritos anteriormente muestran que el pico a 2,10 ppm en los espectros ^{1}H 1D-RMN de heparina no es OSCS y en cambio es una firma estructural característica que refleja una etapa de procesamiento oxidativo en la fabricación de heparina no fraccionada. Con base en los experimentos descritos anteriormente, el esquema proporcionó resultados probables en las estructuras A y B de la figura 16. Los agentes de oxidación, tales como $KMnO_4$, reaccionan con los restos reductores *de N*-acetilglucosamina para generar un residuo de ácido *N*-acetilglucosamínico modificado (estructura A) en el extremo reductor de la cadena de heparina. En esta situación, la señal recién formada a 4,37 ppm/58,9 ppm en el espectro HSQC se puede asignar al protón en la posición C2 del ácido *N*-acetilglucosamínico recién generado. También es posible que se produzca una oxidación adicional de esta estructura, lo que resulta en la formación de un ácido dicarboxílico (estructura B), sin embargo, no se proporciona confirmación de esta estructura en la actualidad. Este esquema (figura 16), también explica por qué la aparición de la señal a 2,10 ppm en el espectro 1H-RMN depende de la presencia de *N*-acetilglucosamina de extremo reductor. Finalmente, dado que la formación de estas estructuras resulta de condiciones de oxidación, los investigadores anticiparon que otras condiciones de oxidación, más allá del permanganato de potasio, también podrían resultar

potencialmente en la formación de dichas estructuras.

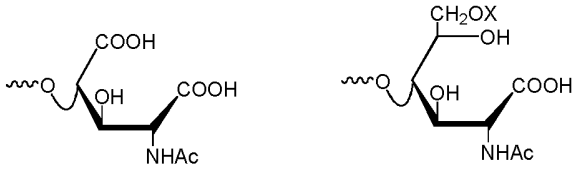
[0038] En conclusión, se descubrió que las condiciones de oxidación resultan en la conversión de residuos *de N*-acetilglucosamina en el extremo reductor de las cadenas de heparina en un ácido *N*-acetilglucosamínico que produce una señal característica a 2,10 ppm en el espectro 1H-RMN de la heparina. Por lo tanto, esta señal no surge de una impureza o contaminante presente dentro de la heparina, sino que representa una parte de la propia cadena de heparina.

[0039] Las modificaciones y variaciones de los procedimientos conforme a la invención son posibles dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar si se utilizó un procedimiento que incluye oxidación u oxidación seguido de tratamiento con un ácido para elaborar una muestra de heparina, que comprende:

determinar si una firma estructural está ausente o presente en una muestra de heparina y/o determinar la cantidad de la firma estructural en la muestra de heparina, donde la ausencia o presencia de la firma estructural se determina usando resonancia magnética nuclear (RMN), donde la presencia de la firma estructural y/o la presencia en una cantidad indica que la muestra de heparina fue elaborada mediante un procedimiento y la ausencia de la firma estructural indica que la muestra de heparina no fue elaborada mediante el procedimiento; y
realizar una etapa con respecto a la muestra de heparina si la muestra de heparina se elaboró mediante el procedimiento, donde la etapa es una o más de procesamiento en un producto farmacéutico, envío, formulación, etiquetado, empaquetado, comercialización, venta y oferta para la venta de la muestra de heparina;
donde la firma estructural es una o más de:



A B

donde en la estructura B, X = H o SO_3.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la muestra de heparina es una muestra de heparina no fraccionada o una muestra de heparina de bajo peso molecular (HBPM).

3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la muestra de heparina es una muestra de heparina no fraccionada y la etapa incluye seleccionar la muestra de heparina no fraccionada para su procesamiento adicional para producir una muestra de HBPM.

4. El procedimiento de la reivindicación 2, donde la muestra de heparina es una muestra de HBPM.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el procedimiento comprende seleccionar la muestra de heparina y procesar la muestra de heparina para producir un producto farmacéutico.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la muestra de heparina es una muestra de heparina no fraccionada y el procedimiento comprende además despolimerizar la muestra de heparina no fraccionada para producir una muestra de HBPM.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, donde se determina la ausencia o presencia de la estructura A y la estructura B.

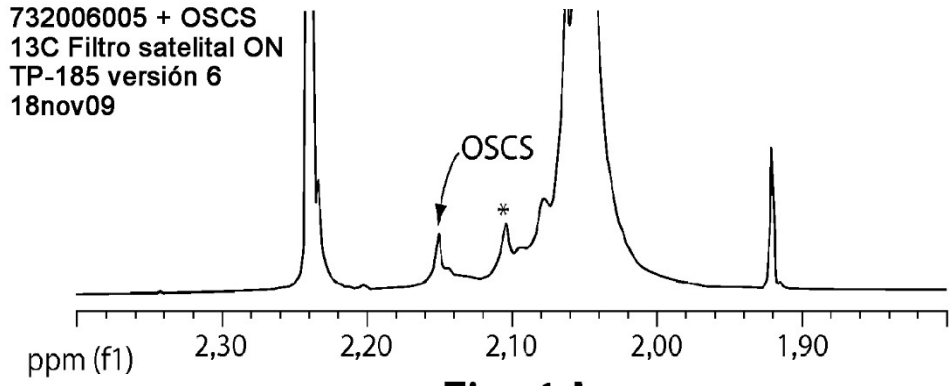

732006005 + OSCS
13C Filtro satelital ON
TP-185 versión 6
18nov09
OSCS
*
ppm (f1)
2,30
2,20
2,10
2,00
1,90

Fig. 1A

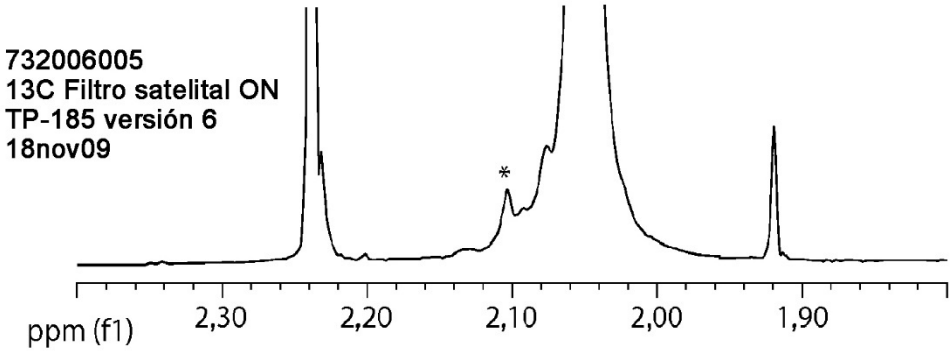

732006005
13C Filtro satelital ON
TP-185 versión 6
18nov09
*
ppm (f1)
2,30
2,20
2,10
2,00
1,90

Fig. 1B

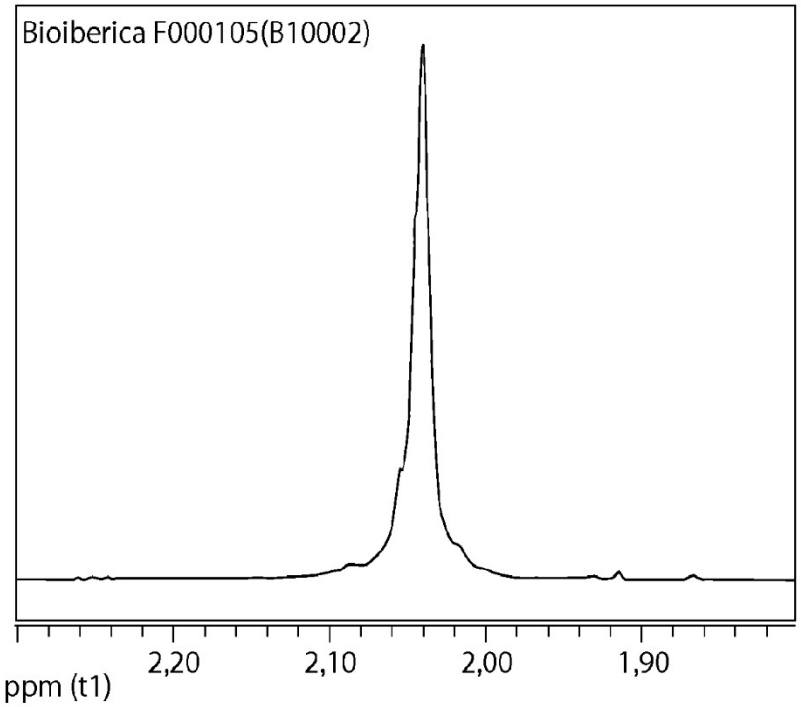

Bioiberica F000105(B10002)
2,20
2,10
2,00
1,90
ppm (t1)

Fig. 2

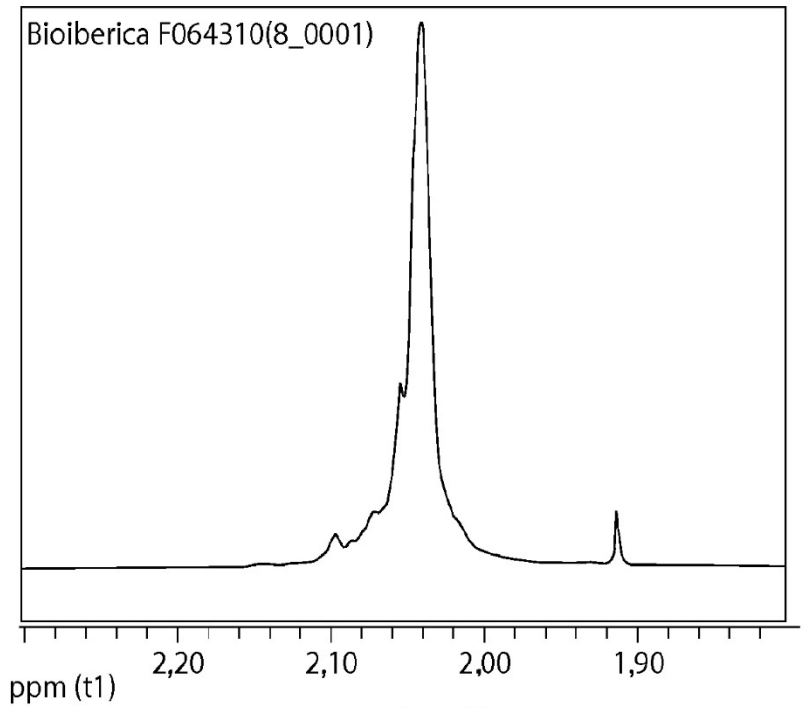

Bioiberica F064310(8_0001)
2,20
2,10
2,00
1,90
ppm (t1)

Fig. 3

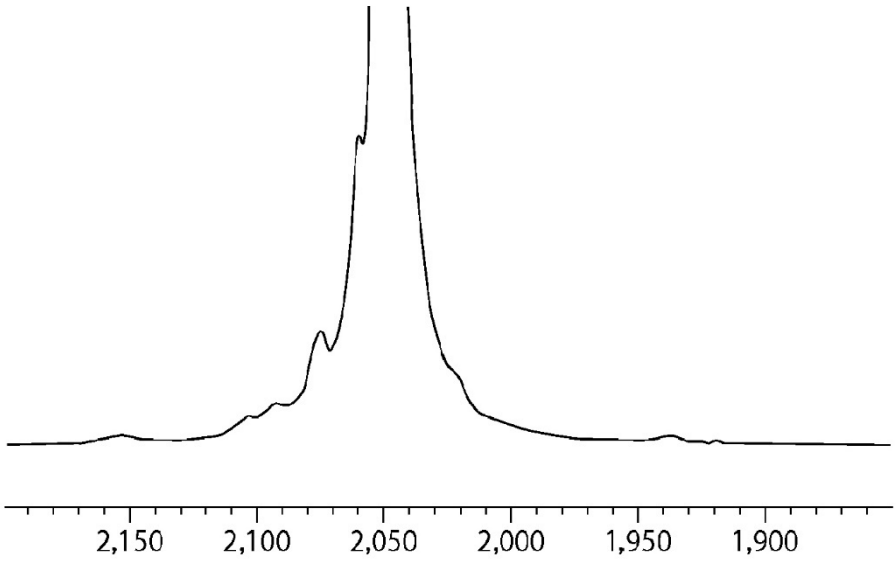

2,150
2,100
2,050
2,000
1,950
1,900

Fig. 4A

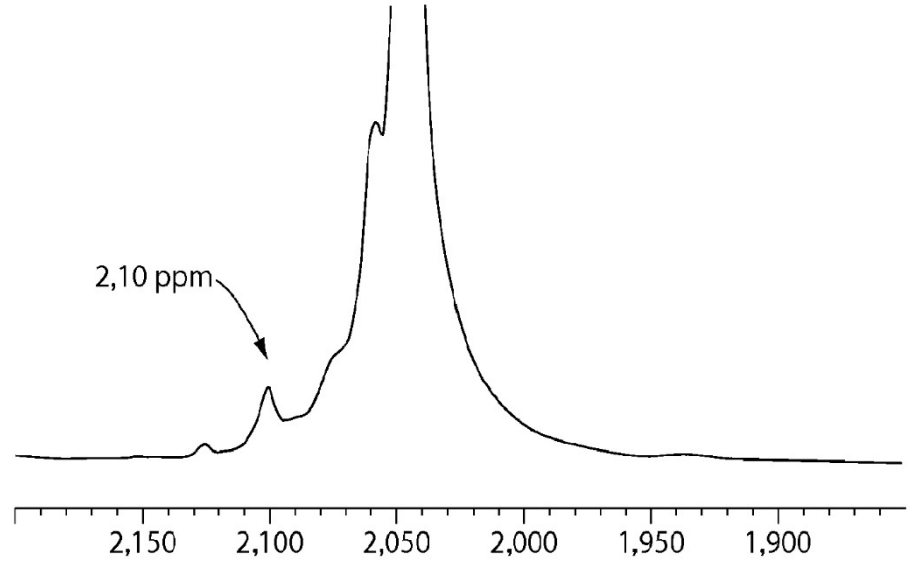

2,10 ppm
2,150
2,100
2,050
2,000
1,950
1,900
ppm (t1)

Fig. 4B

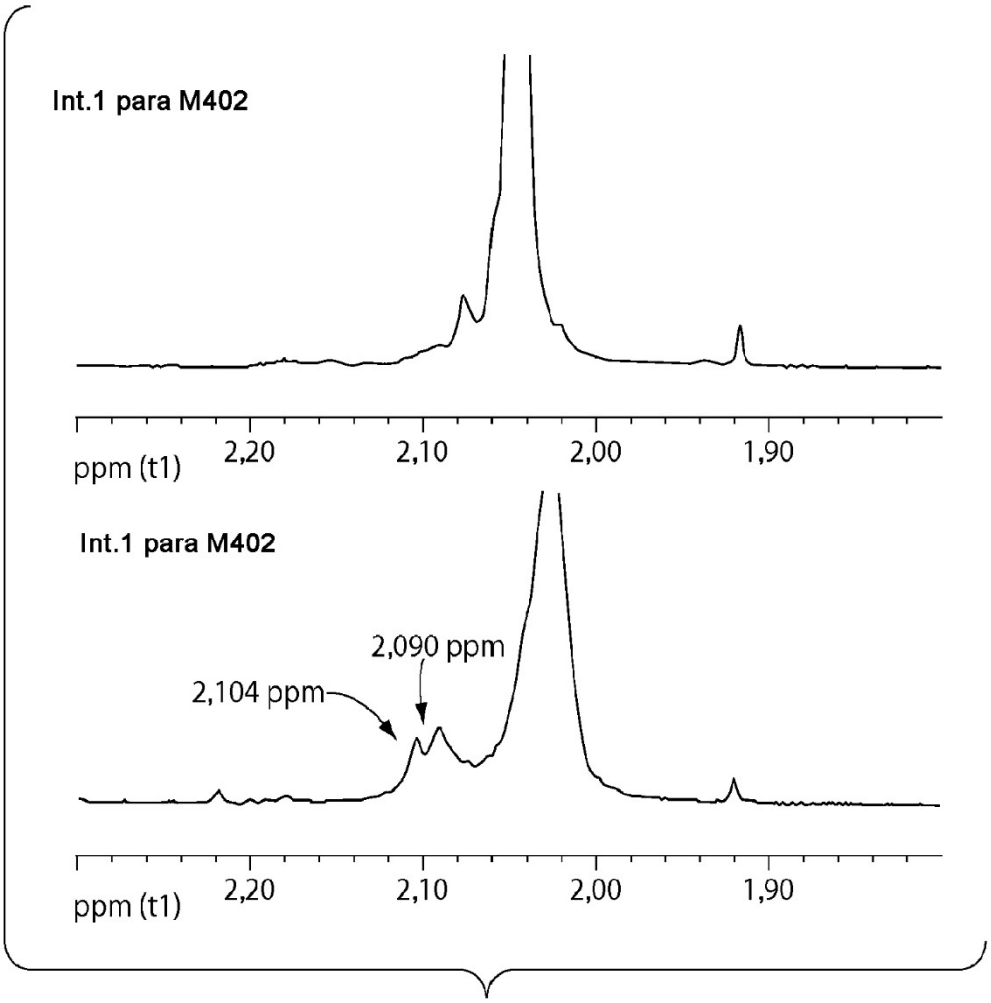

Int.1 para M402
ppm (t1)
2,20
2,10
2,00
1,90
Int.1 para M402
2,090 ppm
2,104 ppm
ppm (t1)
2,20
2,10
2,00
1,90

Fig. 5

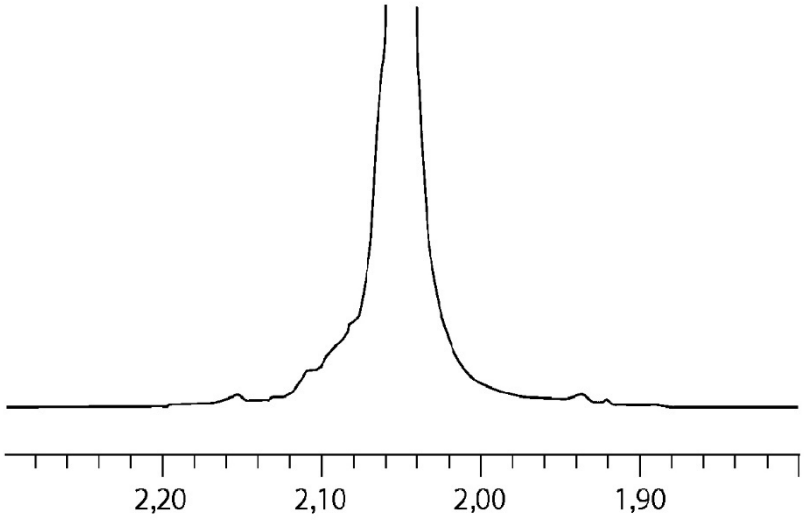


Fig. 6A

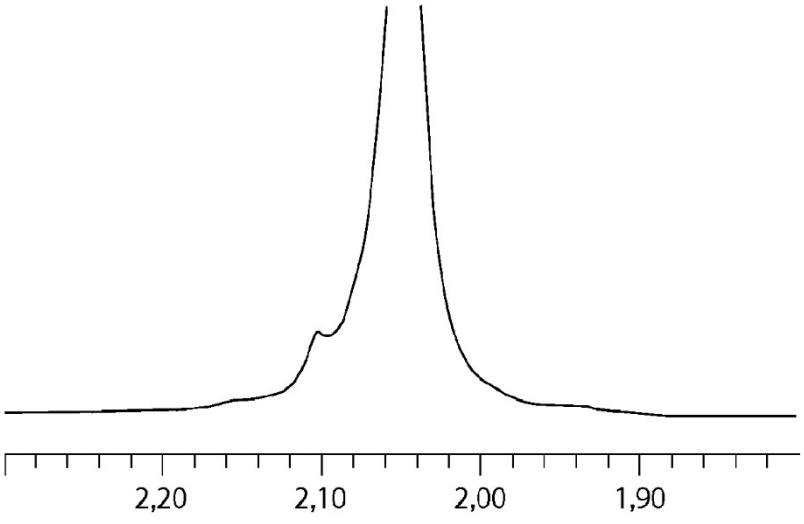


Fig. 6B

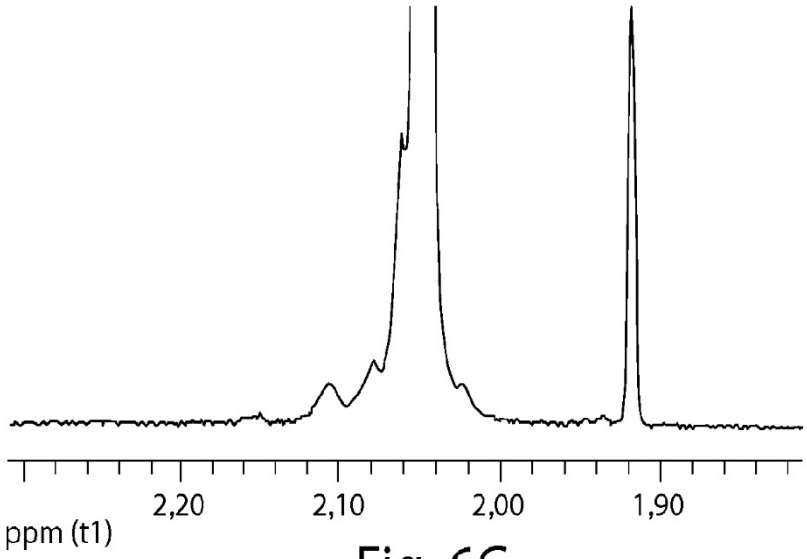


Fig. 6C

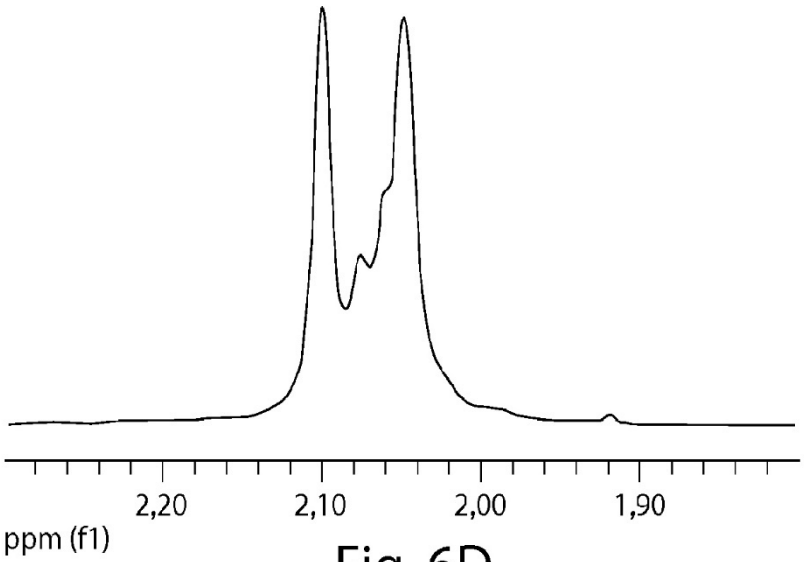


Fig. 6D

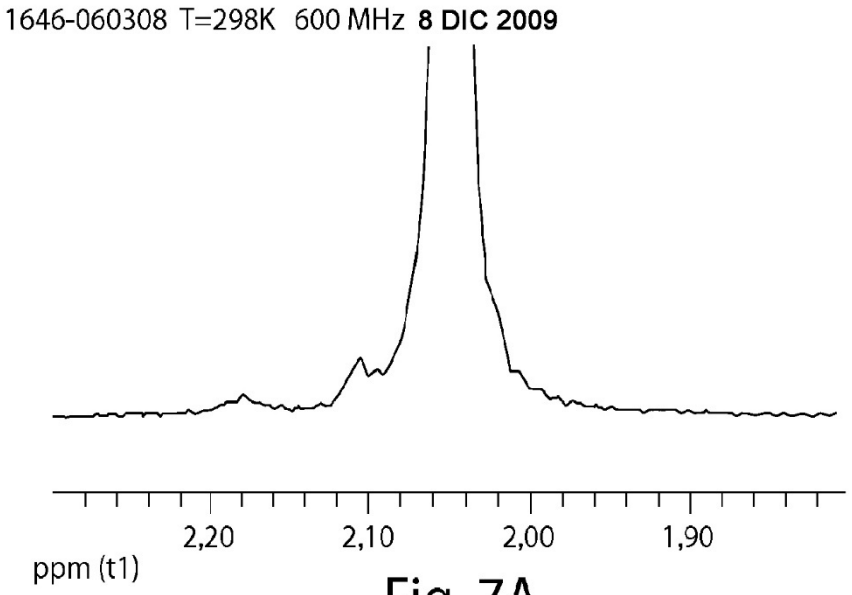

1646-060308 T=298K 600 MHz 8 DIC 2009
2,20
2,10
2,00
1,90
ppm (t1)

Fig. 7A

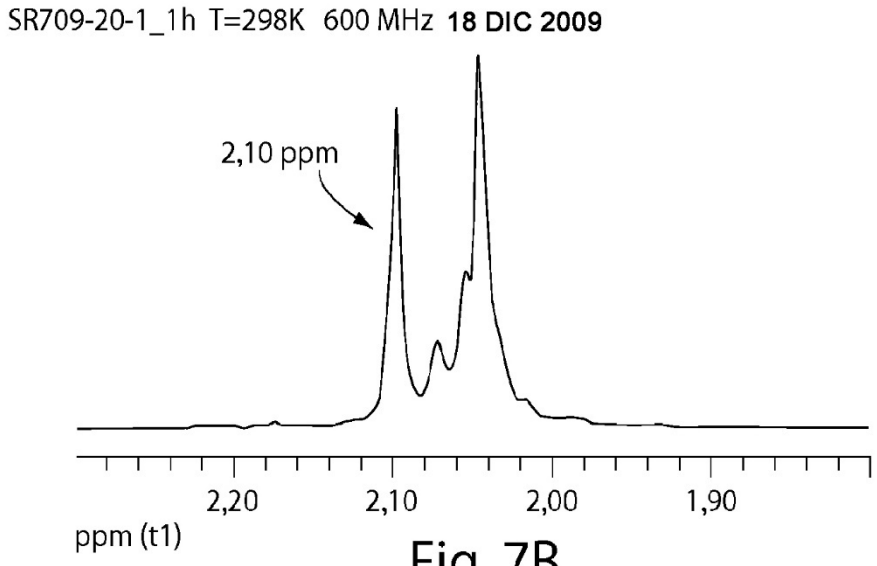

SR709-20-1_1h T=298K 600 MHz 18 DIC 2009
2,10 ppm
2,20
2,10
2,00
1,90
ppm (t1)

Fig. 7B

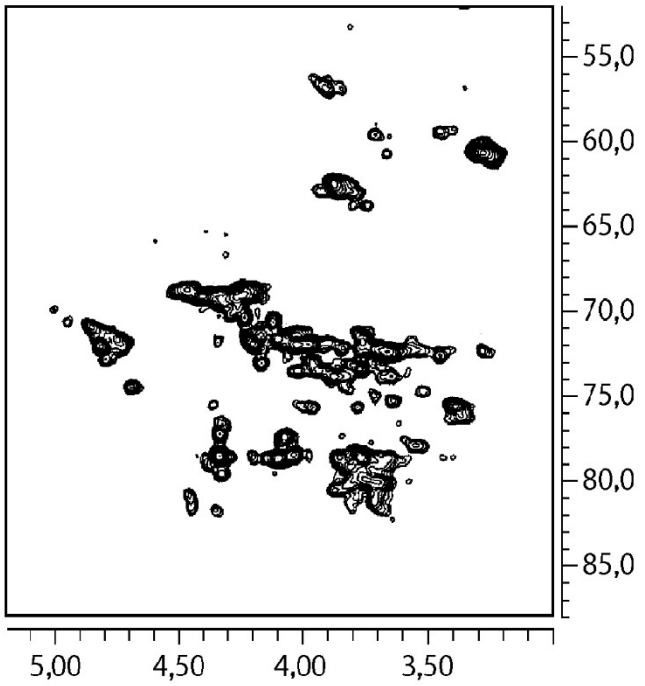

55,0
60,0
65,0
70,0
75,0
80,0
85,0
5,00
4,50
4,00
3,50

Fig. 8A

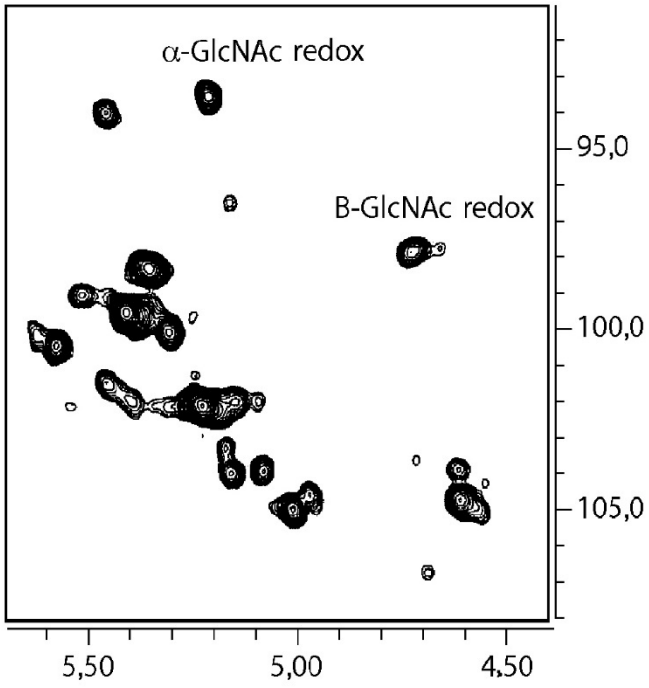

α-GlcNAc redox
B-GlcNAc redox
95,0
100,0
105,0
5,50
5,00
4,50

Fig. 8B

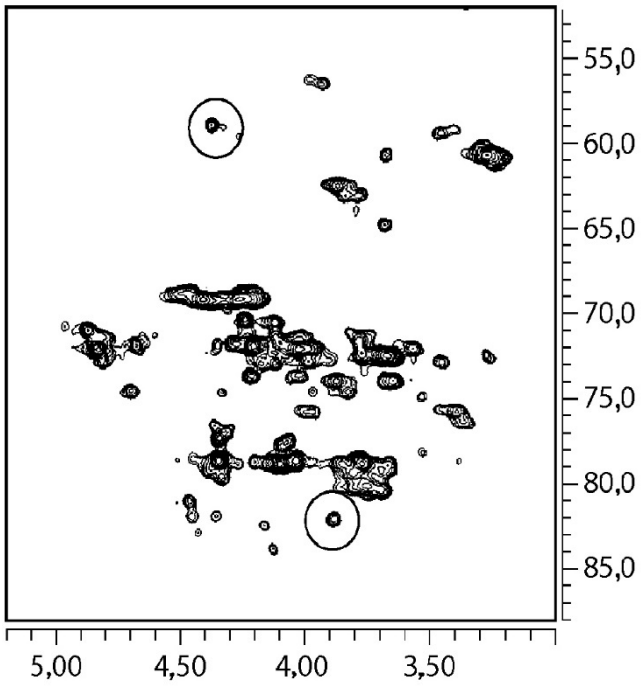

55,0
60,0
65,0
70,0
75,0
80,0
85,0
5,00
4,50
4,00
3,50

Fig. 8C

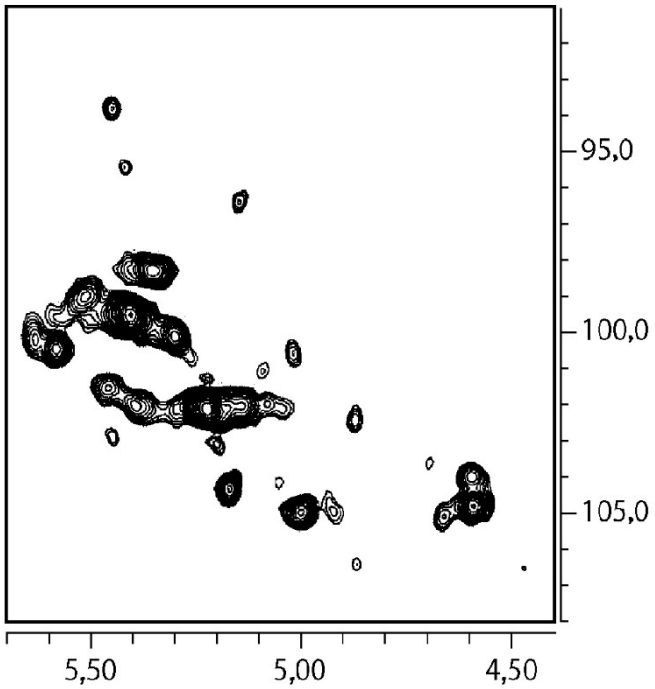

95,0
100,0
105,0
5,50
5,00
4,50

Fig. 8D

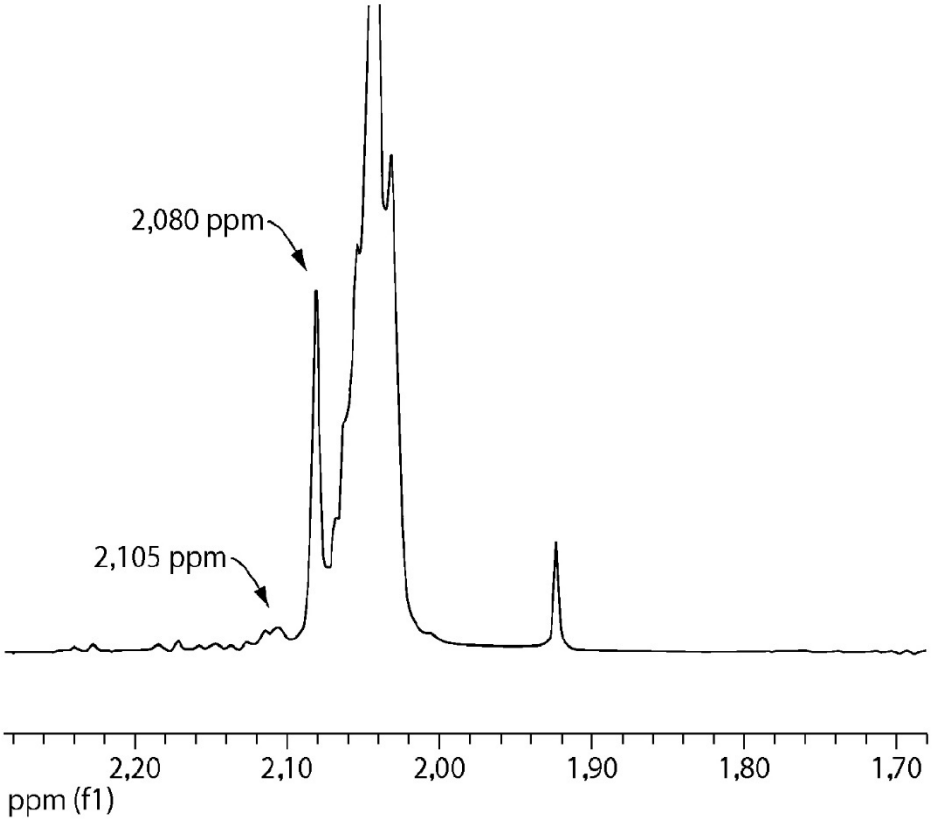


Fig. 9

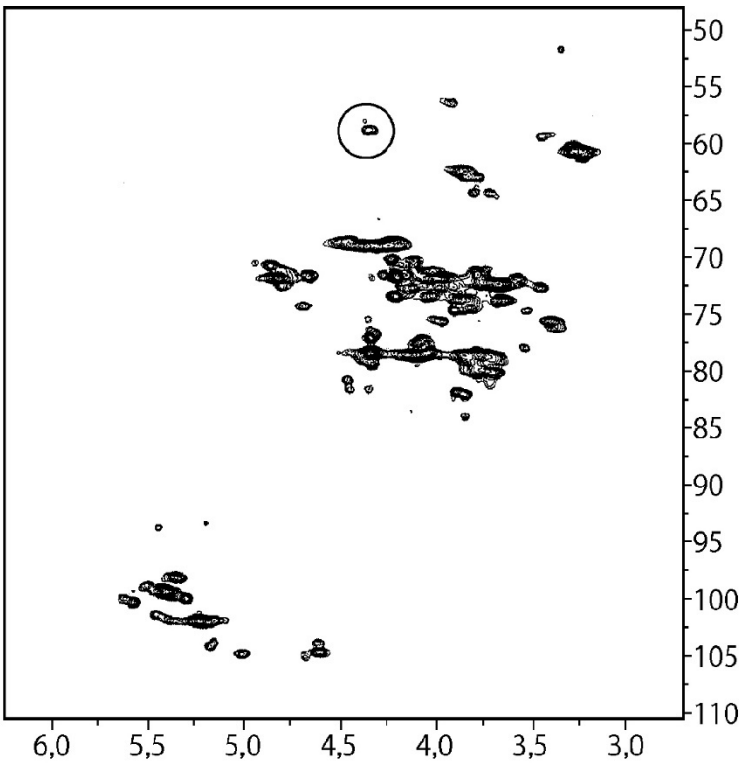


Fig. 10A

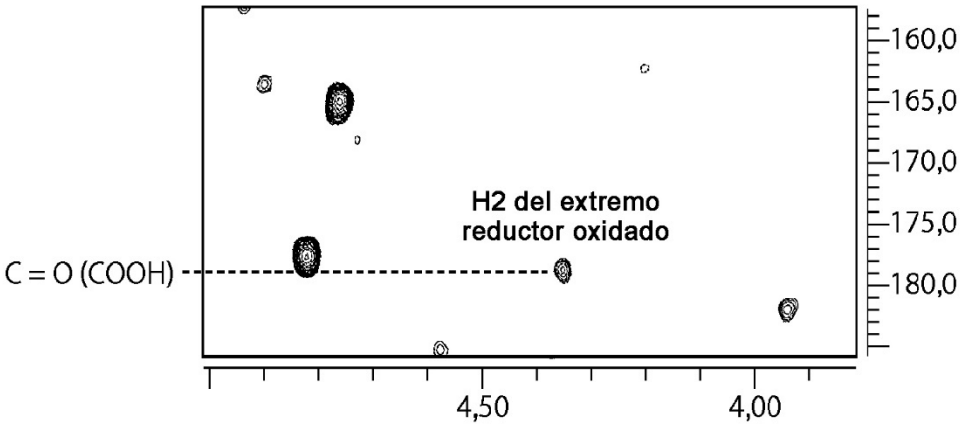


Fig. 10B

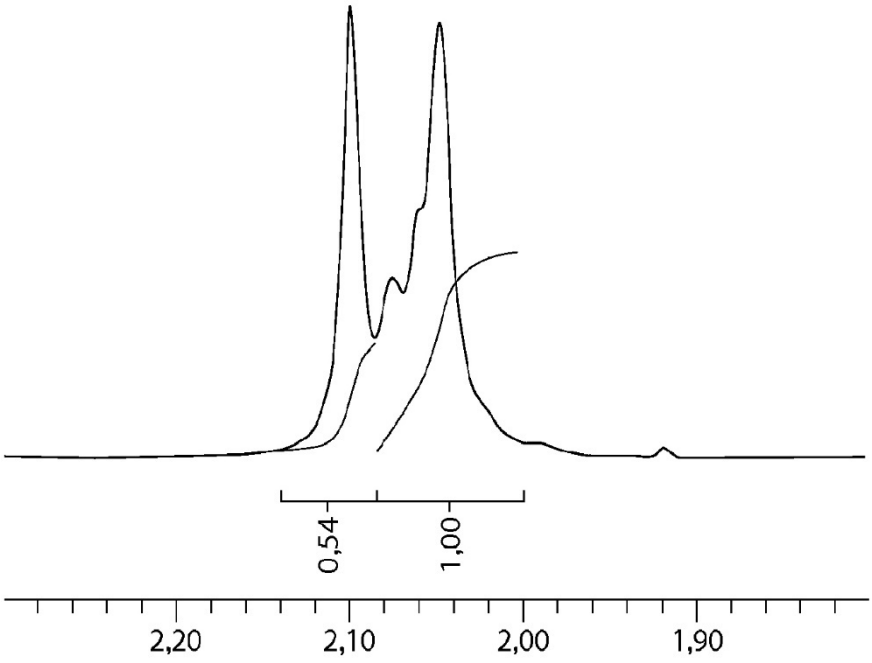


Fig. 11A

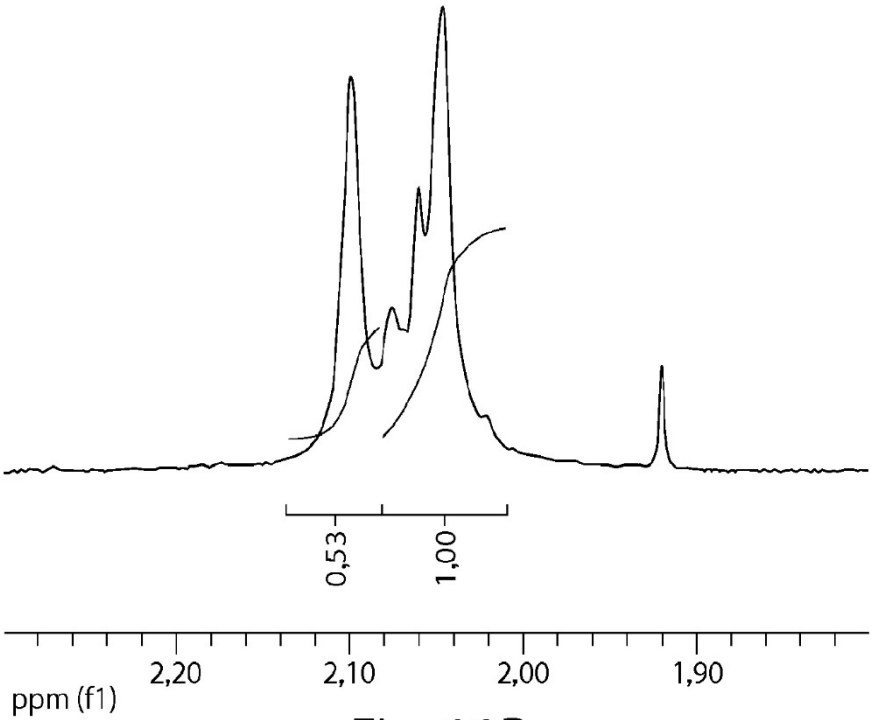


Fig. 11B

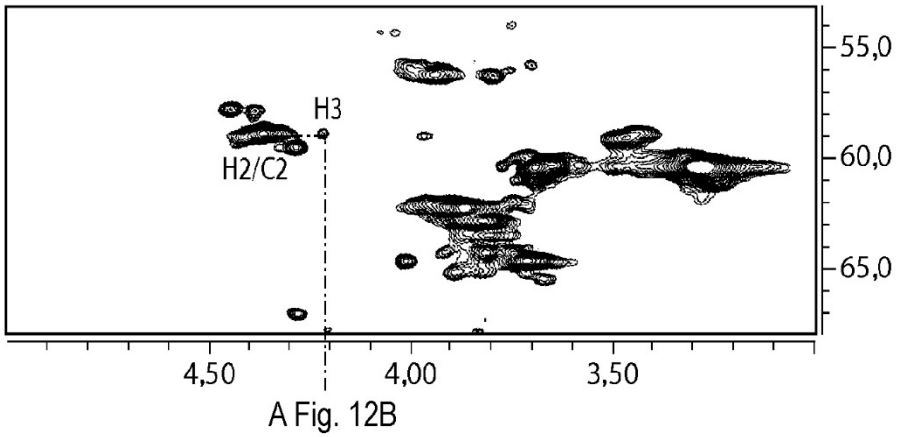


Fig. 12A

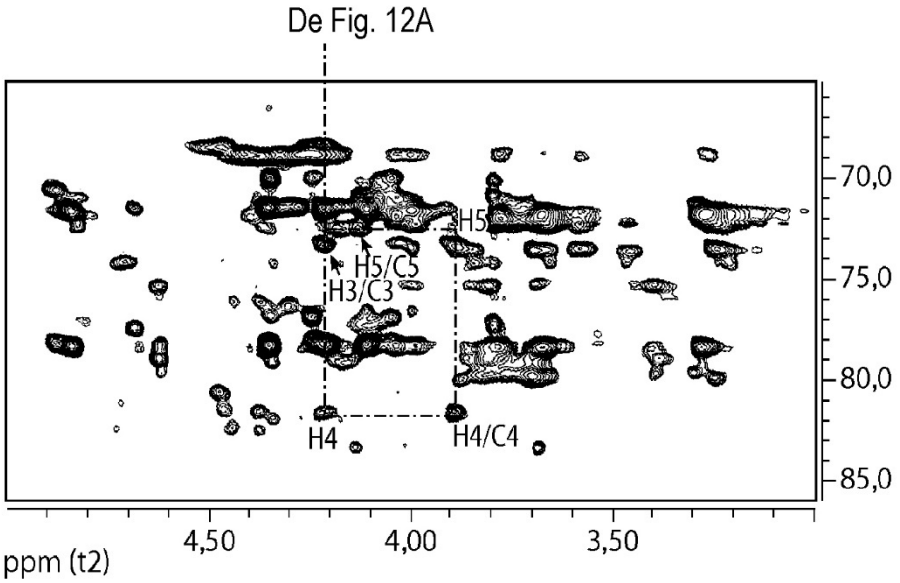


Fig. 12B

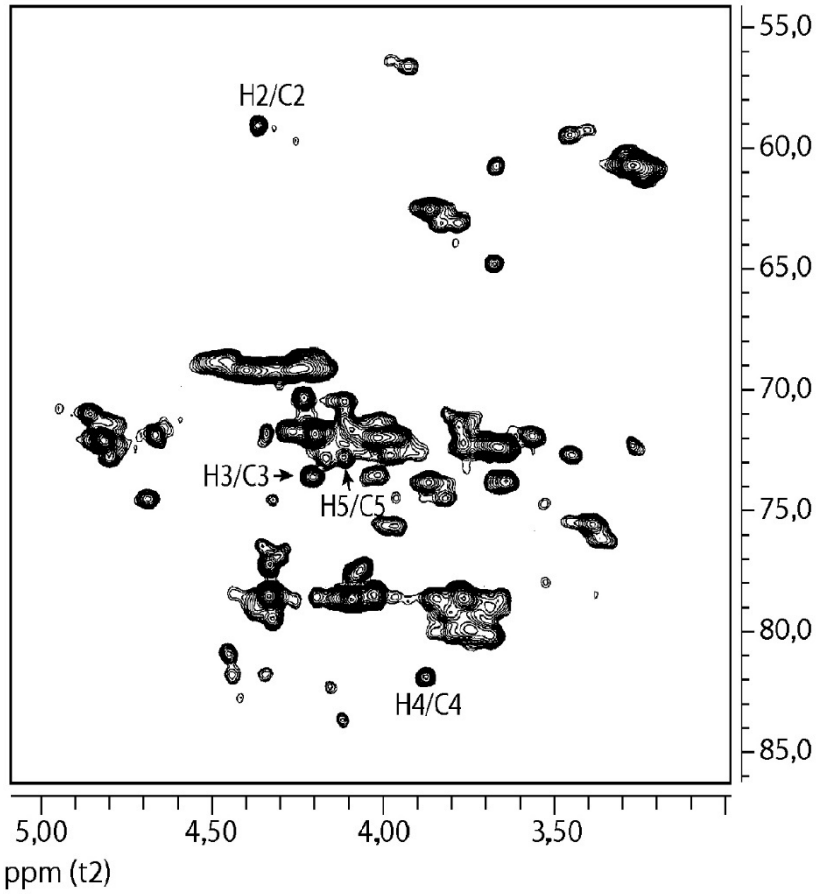

H2/C2
H3/C3
H5/C5
H4/C4
55,0
60,0
65,0
70,0
75,0
80,0
85,0
5,00
4,50
4,00
3,50
ppm (t2)

Fig. 13

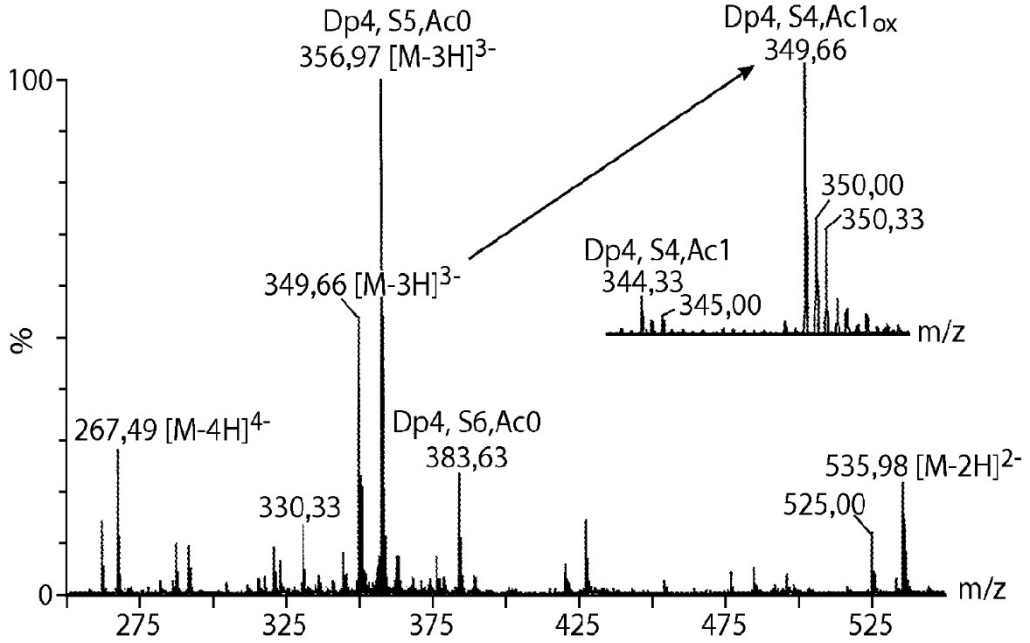

Dp4, S5,Ac0
356,97 [M-3H]3-
Dp4, S4,Ac1ox
349,66
350,00
350,33
Dp4, S4,Ac1
344,33
345,00
349,66 [M-3H]3-
m/z
100
%
267,49 [M-4H]4-
Dp4, S6,Ac0
383,63
330,33
535,98 [M-2H]2-
525,00
0
275
325
375
425
475
525
m/z

Fig. 14

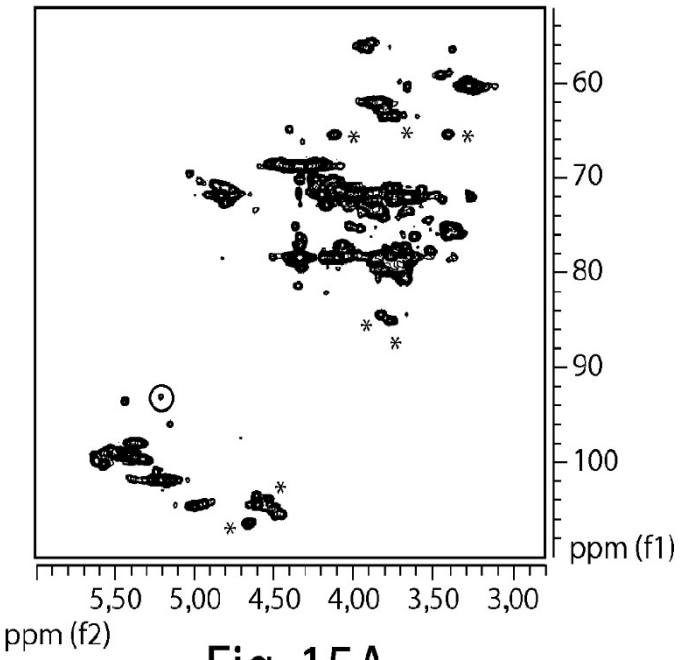


Fig. 15A

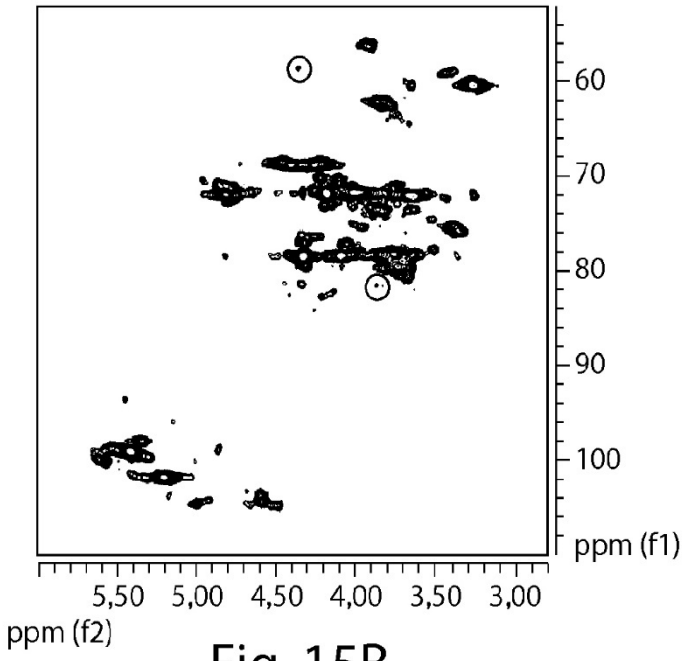


Fig. 15B

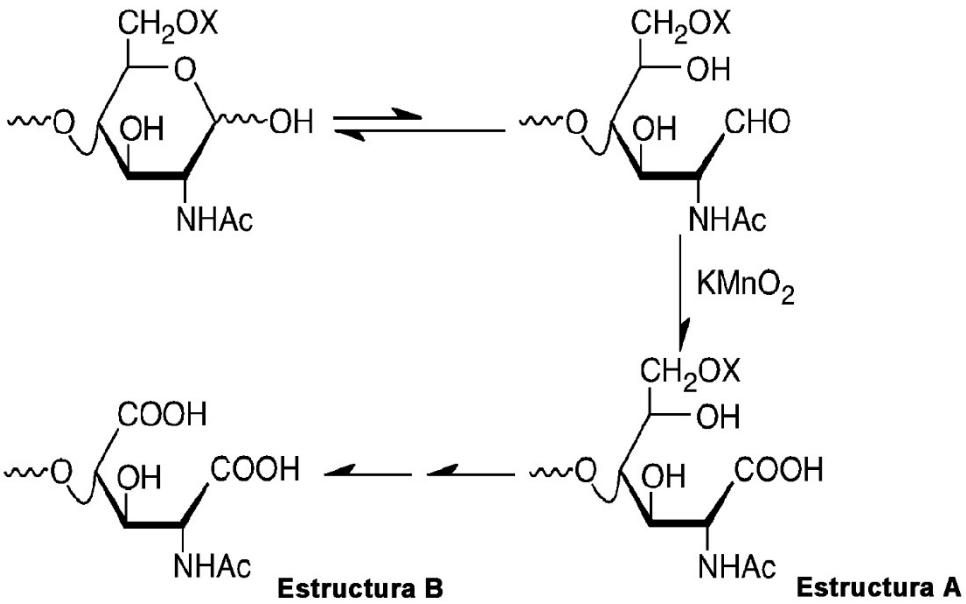

CH2OX
O
OH
OH
NHAc
CH2OX
OH
OH
CHO
NHAc
KMnO2
CH2OX
OH
OH
COOH
NHAc
COOH
OH
COOH
NHAc
Estructura B
Estructura A

Fig. 16