

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 540 0000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-003331- -00011-0000

Fecha: 2008-08-26 16:51:12 Dep. 2020 NULCRLACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 41

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Trámite : 011
Evento : 379
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 03.003.331
Asunto : Solicitud patente para: **MEZCLAS DE
POLISACÁRIDOS DERIVADOS DE HEPARINA, SU
PREPARACIÓN Y LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS
QUE LOS CONTIENEN**
Solicitante : AVENTIS PHARMA S.A.
Fecha solicitud: 20 de enero de 2003

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado me refiero al oficio No. 7020 notificado por fijación en lista del 30 de mayo de 2008.

2. Mediante oficio No. 7020 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

2.1 Descripción

De acuerdo con el Examinador, dentro de la descripción no se presentan los estudios y resultados comparativos de la invención donde se evidencian las ventajas o el salto tecnológico de los compuestos con respecto al estado de la técnica y/o la mejora en los niveles de actividad.

Adicionalmente se menciona que existe falta de claridad por cuanto en la página 2 se hace referencia a "mezclas de oligosacáridos" mientras

CAVELIER

ABOGADOS

que al inicio de la descripción se indica que la invención está relacionada con "mezclas de polisacáridos".

2.2 Análisis de patentabilidad

En este segundo oficio, el Examinador citó nuevamente los documentos D1: EP0027089 y D2: EP0040144 argumentando carencia de nivel inventivo para las reivindicaciones 1 a 6 y 19.

El Examinador entonces expone los mismos argumentos presentados para el primer oficio, excepto para el procedimiento: "Se reconoce el nivel inventivo del procedimiento reivindicado puesto que como recalca en su respuesta el solicitante utiliza diferentes bases en la etapa de despolimerización lo cual resulta en propiedades biológicas específicas para las mezclas reivindicadas".

De esta manera todavía se considera que la única diferencia de la presente solicitud con respecto a D2, es que en este último no se está mencionando la actividad anti-IIa de la mezcla y que al unirse los conocimientos proporcionados por D1 y D2 ya se conocían las mezclas reivindicadas como agentes antitrombóticos con las mismas características y los mismos objetivos o ventajas. El Examinador considera que "una persona conocedora o versada en la materia se vería motivada a utilizar dichas enseñanzas para llegar a lo presentado por la solicitud".

3. Con el fin de subsanar las objeciones presentadas por su Despacho, me permito presentar las siguientes modificaciones, aclaraciones y comentarios:

3.1 Descripción

En relación con la primera objeción del capítulo descriptivo, se solicita atentamente tener en cuenta los ejemplos comparativos que se mencionan en el numeral de respuesta a la objeción del nivel inventivo.

CAVELIER

ABOGADOS

Por otra parte, se ha modificado el término "oligosacáridos" de la página 2 de la descripción por el de "polisacáridos" de manera que no exista falta de claridad. Esto con base en el artículo 34 de la Decisión 486 en el que se establece:

"El solicitante de una patente podrá pedir que se modifique la solicitud en cualquier momento del trámite. La modificación no podrá implicar una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial. De cualquier manera podrá pedir la corrección de cualquier error material".

De esta manera quedarían superadas las objeciones presentadas para la descripción de la presente solicitud.

3.2 Nivel inventivo

De acuerdo con el Manual Andino de Patentes: "La pregunta es ¿qué problema resuelven las diferencias técnicas entre la invención y el estado de la técnica más cercano?. Dichas diferencias, en términos de características técnicas, entre la invención y el estado de la técnica más cercano representan la solución al problema técnico en cuestión. (...) La pregunta a contestar es si teniendo en cuenta el estado de la técnica en su conjunto existe alguna indicación que lleve a la persona versada en la materia a modificar o adaptar el estado de la técnica más cercano para resolver el problema técnico, de tal forma que llegue a un resultado que estuviera incluido en el tenor de la(s) reivindicación(es)".

Ahora bien, se desea manifestar respetuosamente que el Examinador ha malinterpretado el objetivo de la presente invención y los contenidos de los documentos citados D1 y D2. De acuerdo con esto, desarrollaremos a continuación un análisis que indica con mayor claridad por qué la presente invención no carece de nivel inventivo a la luz de los documentos D1 y D2.

CAVELIER

ABOGADOS

3.2.1 La presente invención

Tal como se define en la presente reivindicación 1, la invención está relacionada con mezclas de polisacáridos sulfatados que poseen la estructura general de los polisacáridos constitutivos de la heparina y que presentan las siguientes características físicas y biológicas:

- Características fisicoquímicas:
 - peso molecular promedio: 1500-3000 Da,
 - 2 a 26 unidades de sacáridos
 - un ácido urónico 2-O sulfato en uno de los extremos
- Características biológicas:
 - un anti-factor de actividad Xa (llamado de aquí en adelante actividad "anti-Xa"): 100-150 UI/mg
 - un anti-factor de actividad IIa (llamado de aquí en adelante actividad (anti-IIa): 0-10 UI/mg
 - Relación de actividades anti-Xa/anti-IIa: >10

El objetivo de la presente invención es obtener mezclas de polisacáridos que poseen mayor actividad selectiva hacia el factor X activado (factor Xa) y el factor II activado (factor IIa) con respecto a la heparina (Ver descripción, quinto párrafo). Las mezclas, tal como son definidas en la reivindicación 1, con una actividad anti-Xa de 100-150 UI/mg y una actividad anti-IIa inferior a 10 UI/mg, de manera que poseen una alta proporción anti-Xa/anti-IIa, consiguen este objetivo. }

3.2.2 Fundamentos sobre mezclas de heparina de bajo peso molecular y la importancia de los procedimientos utilizados para su obtención

Para iniciar, algunos fundamentos sobre mezclas de heparina de bajo peso molecular, serán de utilidad para comprender mejor la presente invención, D1 y D2.

CAVELIER**ABOGADOS**

De hecho, mezclas de heparina de bajo peso molecular obtenidas por la despolimerización de la heparina son mezclas muy complejas. Estas están compuestas por cientos de especies de oligosacáridos, obtenidos por la división de la mezcla nativa de heparina, la cual por sí misma es una mezcla heterogénea de cadenas de polisacáridos. En vista de la complejidad de dichas mezclas, varios criterios deben ser tenidos en cuenta a la hora definirlos: no sólo criterios físicos (tal como el peso molecular promedio), sino también las propiedades biológicas (actividades anti-Xa y anti-IIa) son necesarias para definir las mezclas.

El proceso de obtención de las mezclas también es un factor determinante, dado que el proceso utilizado para la despolimerización de la heparina y la base utilizada en la misma, influyen cómo las cadenas de polisacáridos serán fragmentadas en segmentos más cortos.

Esta correlación entre el producto final y el proceso de despolimerización se encuentra bien establecida en el campo de las heparinas y las heparinas de bajo peso molecular (LMW por sus siglas en inglés), a manera de ejemplo, como se describe en J. Med. Chem., 1990(33), páginas 1639-1645 y del cual se presenta una copia junto con este memorial. Ver en particular en la página 1643, segundo párrafo de la columna derecha: "... heparinas comerciales de bajo peso molecular (LMW) no son químicamente equivalentes. Las diferencias son en primera instancia, el resultado de los procesos químicos o enzimáticos utilizados en su despolimerización. La no-equivalencia química de estas preparaciones se ve reflejada en diferentes pesos moleculares, los grados de sulfatación y los mapas oligosacáridos. Estas propiedades fisicoquímicas alteradas afectan las actividades anticoagulantes de las heparinas de bajo peso molecular (LMW), haciéndolas bio-inequivalentes".

Las composiciones de acuerdo con la invención han sido preparadas por medio de un proceso muy específico que comprende:

- Esterificación de la heparina (éster bencílico de heparina)

CAVELIER

ABOGADOS

- Y luego la despolimerización de una sal cuaternaria de este éster bencílico de heparina, utilizándose una base orgánica fuerte tal como se define en la presente reivindicación 7 (Ver la descripción, página 2 último párrafo a página 4 primer párrafo y página 4 desde el penúltimo párrafo a página 5 segundo párrafo).

Cualquier cambio en el proceso para la obtención de las mezclas de polisacáridos, induce una alta probabilidad de obtener mezclas de polisacáridos con propiedades fisicoquímicas y biológicas fuera del objetivo de la presente solicitud de patente.

3.2.3 Comparación de la presente invención versus D1 y D2

En primer lugar se desea poner de presente de manera respetuosa, que no estamos de acuerdo cuando el Examinador afirma que *"la única diferencia con D2 es que este documento no menciona la actividad anti-IIa de la mezcla"*. De hecho, la tabla comparativa realizada por el Examinador entre la presente invención y el arte previo presenta errores que mencionaremos y adicionalmente demostraremos a continuación que la presente invención no se deriva de la combinación de las enseñanzas de D1 y D2.

En particular, ni en D1 ni en D2 existe una descripción de mezclas de polisacáridos sulfatados que posean, al mismo tiempo, un peso molecular promedio comprendido entre 1500 y 3000 Da, una actividad anti-Xa de 100-150 UI/mg y una actividad anti-IIa de 0-10 UI/mg, tal como será demostrado en el análisis detallado a continuación.

3.2.3.1 Documento D1 (EP 0 027 089 A1)***Características fisicoquímicas y biológicas de los productos de D1******- Actividad Anti-Xa***

D1 describe oligosacáridos y fracciones que los contienen y que poseen una alta actividad anti-Xa y una muy baja actividad anticoagulante global (página 4, líneas 5 a 8 y página 5, líneas 16 a 18).

La actividad anti-Xa de las fracciones de oligosacáridos y de los oligosacáridos en D1 es preferiblemente mayor que la de la heparina (página 5, líneas 16-17 y página 8, líneas 2 a 5). En el ejemplo 1, la actividad anti-Xa de la heparina es dada como 150 UI/mg (página 20, línea 15): D1 entonces se relaciona con fracciones de oligosacáridos y oligosacáridos que poseen una actividad anti-Xa mayor a 150UI/mg. En la página 8, líneas 5 a 6, se especifica además que la actividad anti-Xa de las fracciones de oligosacáridos y de los oligosacáridos puede ser 10 veces mayor que la de la heparina, con valores que alcanzan los 2000 UI/mg (página 8, líneas 10 a 11).

Por el contrario, la presente invención reivindica mezclas con una actividad anti-Xa de 100 a 150 UI/mg.

- Actividad anti-IIa

D1 no menciona la actividad anti-IIa.

Por el contrario, la presente invención reivindica mezclas con una actividad anti-IIa de 0 a 10 UI/mg.

- Peso molecular promedio, número de unidades de sacárido

D1 no menciona el rango de peso molecular promedio de las fracciones de oligosacáridos; sólo se menciona que los fragmentos obtenidos después de la despolimerización de la heparina contienen no más de 8 unidades de sacáridos (página 4, líneas 32 a 35 y página 6, líneas 1 a 10).

Por el contrario, la presente invención reivindica mezclas con un peso molecular promedio de 1500-3000 Da y en donde los polisacáridos que constituyen las mezclas contienen de 2 a 26 unidades de sacáridos.

Proceso de obtención de los productos de acuerdo con D1

En D1, las fracciones de oligosacáridos se obtienen por el siguiente proceso (página 4, línea 23 a página 5, línea 13):

- Despolimerización de la heparina o de fracciones heparínicas

CAVELIER**ABOGADOS**

- Tratamiento de la mezcla de despolimerización para separar por lo menos la mayor parte de las cadenas de oligosacáridos por (a) poner en contacto la mezcla de despolimerización con ATIII, (b) eliminar los productos no seleccionados, y (c) recuperar los productos seleccionados.

Contrario al proceso utilizado en la presente invención, en D1 no existe el paso de esterificación de la heparina antes de su despolimerización. Adicionalmente, en D1 la despolimerización de la heparina es llevada a cabo también químicamente por ácido nitroso (columna 3, línea 52 y ejemplo 1), la cual no es una base que hace parte de la familia de aquella utilizada en la presente invención (ver presente reivindicación 7), o por un proceso enzimático (página 6, línea 22 y ejemplos 2 y 3).

Además, con el objeto de obtenerse oligosacáridos y fracciones que los contienen con las deseadas propiedades antitrombóticas, en D1 la mezcla de despolimerización es sometida a pasos de fraccionamiento para separar selectivamente los oligosacáridos que tienen cadenas cortas (página 5, líneas 3 a 13 y 19 a 38). Para este fin, se utiliza la cromatografía de afinidad, opcionalmente antes de la separación por permeación en gel (página 7, líneas 4 a 22).

- Esto es ilustrado en el ejemplo 1 de D1: la despolimerización de la heparina con ácido nitroso genera una mezcla que posee actividad anti-Xa de 7 UI/mg (página 20, línea 29), que luego es sometida a cromatografía ATIII para recuperar una mezcla de polisacáridos que poseen una actividad anti-Xa de 1600 UI/mg (página 21, línea 16). Con peso molecular heterogéneo (página 21, líneas 17 a 19). La mezcla es luego sometida a filtración en gel para separar los oligosacáridos específicos que constituyen la mezcla.
- De manera similar en el ejemplo 2, la despolimerización enzimática de la heparina es luego seguida por un paso de fraccionamiento y por cromatografía de afinidad, de manera que se

CAVELIER

ABOGADOS

recupera una fracción con una actividad anti-Xa de 1400 UI/mg (página 25, línea 24).

- De manera similar también en el ejemplo 3, la despolimerización enzimática de la heparina es seguida por cromatografía de afinidad para recuperar una fracción con una actividad anti-Xa de 800 UI/mg (página 28, línea 24) y luego es sometida a filtración en gel para recuperar algunas fracciones con actividades anti-Xa respectivas de 1200, 930, 200, y 330 UI/mg (tabla de la página 30).

Por lo tanto, en D1, los compuestos con una afinidad específica ATIII (y por ello con una alta actividad anti-Xa) son aislados de la mezcla cruda obtenida tras el paso de despolimerización. Por el contrario, las mezclas de polisacáridos de acuerdo con la presente invención son el resultado directo de un proceso específico, utilizándose una base completamente diferente en el paso clave de despolimerización, sin necesidad de proceder a una separación de cromatografía adicional para los componentes activos.

Tal como se mencionó anteriormente, diferentes procesos para obtener heparinas de bajo peso molecular conllevan a la obtención de productos diferentes. En la presente invención, las mezclas de polisacáridos de bajo peso molecular con las propiedades deseadas son obtenidas directamente después del paso de despolimerización, sin necesidad de fraccionar las cadenas de oligosacáridos obtenidas después de la despolimerización, mientras que en D1, el paso de despolimerización genera una mezcla con baja actividad anti-Xa, que debe ser sometida a una cromatografía de afinidad para seleccionar a partir de allí las fracciones de oligosacáridos específicos con muy altas actividades anti-Xa.

Conclusión sobre D1

Hemos entonces demostrado que, comparado con los productos descritos en D1, las mezclas de polisacáridos de acuerdo con la invención:

CAVELIER

ABOGADOS

- tienen diferentes propiedades fisicoquímicas (en particular la distribución del peso molecular promedio de las mezclas),
- tienen diferentes propiedades biológicas (actividades anti-Xa y anti-IIa),
- no están purificadas/isoladas por cromatografía,

Un técnico versado en la materia, en vista de las enseñanzas de D1, no habría derivado de manera obvia la presente invención, dado que los problemas técnicos a solucionar y las soluciones descritas son completamente diferentes.

3.2.3.1 Documento D2 (EP 0 040 144 A1)

Características fisicoquímicas y biológicas de los productos de D2

En D2, tres categorías de mezclas son definidas en la tabla A (página 5).

El peso molecular de los productos de la categoría III se superpone parcialmente con el rango de peso molecular de las mezclas de acuerdo con la presente invención (Ver página 5, líneas 18 a 19: 2000-7000 Da).

Para aquellos productos de la categoría III la actividad anti-Xa es de 80 a 250 UI/mg (página 5, línea 23).

La actividad A.P.T.T. de los productos también es descrita en la tabla A (ver página 5). Tal actividad se correlaciona con la actividad anti-IIa (ver página 2, líneas 1 a 5, en donde la actividad A.P.T.T. mencionada para la heparina es de la misma magnitud que su actividad anti-IIa, siendo bien conocido que la heparina tiene una proporción de actividades anti-Xa/anti-IIa alrededor de 1). De acuerdo con esto, inmediatamente se indica que los productos de la categoría III en la tabla A presentan una actividad anti-IIa de 10 a 80 UI/mg. Por esto, la actividad anti-IIa de las mezclas descritas en D1 es mayor que la actividad anti-IIa de las mezclas de acuerdo con la presente invención,

CAVELIER**ABOGADOS**

conllevando a los riesgos de hemorragia asociados (ver página 1, tercer párrafo de la descripción tal como fue presentada).

Más específicamente, el único ejemplo presentado en D2 para el cual las mezclas poseen un peso molecular promedio dentro del rango reivindicado en la presente invención (1500-3000 Da) es el ejemplo 11 (peso molecular promedio = 2800 Da). Sin embargo, la mezcla de acuerdo con el ejemplo 11 de D2 no posee ninguna de las propiedades biológicas tal como se reivindican en la presente invención (ver tabla B en la página 25). En particular, se muestra una baja actividad anti-Xa (90 UI/mg) y una alta actividad anti-IIa, expresada como A.P.T.T. (20 UI/mg), tal como ya se había discutido en la respuesta a la primera acción oficial.

Para resumir, la comparación de las mezclas de acuerdo con la presente invención y de las mezclas de acuerdo con D2 es la siguiente:

	Presente invención	D2 (tabla A, categoría III)	Ejemplo 11 de D2
Peso molecular promedio (Da)	1500-3000	2000-7000	2800
Actividad anti-Xa (UI/mg)	100-150	80-250	90
Actividad anti-IIa)	0-10	10-80	20

Por lo tanto, D2 no permite que un técnico versado en la materia provea mezclas de polisacáridos que poseen por lo menos las tres siguientes características presentadas en la presente reivindicación 1, a saber:

- peso molecular promedio comprendido entre 1500-3000 Da,
- actividad anti-Xa comprendida entre 100 y 150 UI/mg, y
- actividad anti-IIa entre 0 y 10 UI/mg

Proceso de obtención de los productos de acuerdo con D2

Las diferencias entre las propiedades biológicas de las mezclas de la presente invención y de aquellas de D2 pueden ser explicadas por los procesos utilizados para su obtención, los cuales difieren.

CAVELIER**ABOGADOS**

En D2, las bases utilizadas para el paso de despolimerización son hidróxido de sodio (ejemplos 1 a 7, 9 a 11, 14, 15 y 19), 1,5-diaza-biciclo-[4,3,0]-5-noneno (ejemplos 8 y 16 a 18), carbonato de sodio (ejemplo 12) o trietilamina (ejemplo 13). Estas bases difieren de aquellas utilizadas en la presente invención, las cuales son seleccionadas de las bases de la familia de la guanidina y fosfazenos, a saber: 1,5,7-triaza-biciclo-[4,4,0]-dec-5-eno (ejemplos 1, 3 y 6), 2-tert-butylimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafosforina (ejemplos 2 y 7), 2-tert-butylimino-tris-(dimetilamino)fosforano (ejemplo 4), o imidazolato de sodio (ejemplo 5).

Tal como es conocido para un técnico versado en química de oligosacáridos (ver J. Med. Chem., mencionado anteriormente), cualquier cambio en el proceso utilizado para la despolimerización de la heparina genera un impacto sobre las mezclas de polisacáridos obtenidas, lo que podría explicar que las mezclas descritas en D2 poseen propiedades biológicas diferentes que aquellas de la presente invención.

Conclusión sobre D2

Hemos demostrado que, comparando los productos descritos en D2, las mezclas de polisacáridos de acuerdo con la invención:

- poseen diferentes propiedades biológicas,
- se obtienen por procesos completamente diferentes de preparación

CONCLUSIÓN

Se ha demostrado que D2, considerado por el Examinador como el arte previo más cercano, no permite que un técnico versado en la materia provea mezclas de polisacáridos que combinan por lo menos, las tres siguientes características presentadas en la presente reivindicación 1, a saber:

- peso molecular promedio comprendido entre 1500-3000 Da,
- actividad anti-Xa comprendida entre 100 y 150 UI/mg, y
- actividad anti-IIa entre 0 y 10 UI/mg

CAVELIER

ABOGADOS

Ahora bien, combinar D1 con D2 tampoco curaría esta deficiencia de D2 y no permitiría a un técnico en la materia llegar a las mezclas reivindicadas porque:

- Las fracciones de oligosacáridos de D1 poseen una actividad anti-Xa muy alta, mayor que aquella reivindicada para las mezclas de la presente solicitud, y
- D1 no menciona la actividad anti-IIa

De hecho, la tabla comparativa con el arte previo es la siguiente:

Características reivindicadas	D1	D2
Mezclas de polisacáridos sulfatados que poseen la estructura general de la heparina	Sí	Sí
PM: 1500-3000 Da	No	Sí
Actividad anti-Xa: 100-150 UI/mg	No	No (ejemplo 11)
Actividad anti-IIa: 0-10 UI/mg	No	No
Relación anti-Xa/anti-IIa mayor a 10	No	No

Las mezclas de polisacáridos de acuerdo con la invención, tal como definidas en las presentes reivindicaciones presentadas en respuesta a la primera acción oficial, poseen entonces nivel inventivo sobre los documentos D1 y D2.

El Examinador ha solicitado demostrar un "efecto superior" sobre el arte previamente conocido y aunque en la acción oficial se objetó el nivel inventivo no asociado a este efecto superior sino a las sugerencias y enseñanzas realizadas por el arte previo, se desea señalar que la presente invención presenta un mejoramiento significativo al campo terapéutico, dado que las mezclas poseen una actividad selectiva mayor hacia el factor Xa y el factor IIa (relación mayor a 10) comparado con la heparina y con los compuestos descritos en D1 y D2 y por lo tanto generando menores riesgos de hemorragia.

4. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación. En caso de que su Despacho

CAVELIER

ABOGADOS

considere que todavía existen objeciones respecto a esta invención, respetuosamente solicito la emisión de una nueva Acción Oficial para atenderlas.

5. ANEXOS

- Nuevo capítulo descriptivo.
- Copia del documento: J. Med. Chem., 1990(33), páginas 1639-1645
- Formulario para modificaciones.
- Recibo por concepto de modificaciones en solicitud pendiente.

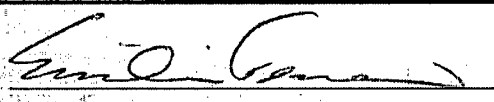
Señora Jefe,

**EMILIO FERRERO**

T.P.A. No. 31.929

COLO-12457-841-005-0
JMS\JMS\ID-132848\WPC12457
No. M-2008-132848\JMS

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1	SOLICITUD DE: ☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud	
2 SOLICITANTE	Nombre: AVENTIS PHARMA S. A. Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Francia. Dirección: 20 Avenue Raymond Aron, 91260 Antony, Francia Domicilio: Antony, Francia Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@camyp.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: Emilio FERRERO Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>438.019 TP 31.929</u>
4	Número de expediente: <u>03.003.331</u>	
5	Descripción de la corrección o modificación solicitada: Presento nuevo capítulo descriptivo en el cual se ha cambiado la página 2 del texto original y se ha modificado el término "oligosacáridos" por el de " <u>polisacáridos</u> ", por lo tanto, solicito a su Despacho tener en cuenta esta modificación al momento de realizar el estudio de patentabilidad de la presente Solicitud de Patente.	
6	Comprobante de pago No. <u>08-62, 244</u> Fecha: <u>4 de agosto de 2008</u>	
7	Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$103.000, por concepto de modificaciones. ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.	
8	NOMBRE: EMILIO FERRERO FIRMA:  C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929	

MEZCLAS DE POLISACARIDOS DERIVADOS DE HEPARINA, SU PREPARACIÓN Y
LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS CONTIENEN

La presente invención se relaciona con las mezclas de polisacáridos derivados de heparina; su procedimiento de preparación y las composiciones farmacéuticas que los contienen.

La heparina es una mezcla de mucopolisacáridos sulfatados de origen animal, utilizada especialmente por sus propiedades anticoagulantes y antitrombóticas.

Sin embargo la heparina presenta inconvenientes que limitan las condiciones de su utilización. Especialmente, su importante actividad anticoagulante (actividad anti-IIa) puede ocasionar hemorragias.

Se propusieron heparinas de bajo peso molecular obtenidas mediante despolimerización básica de ésteres de heparina (EP40144); sin embargo, estos productos siguen teniendo una importante actividad anti-IIa.

La invención se relaciona con mezclas de polisacáridos derivados de heparina que posee una actividad mas selectiva con respecto al factor X activado (factor Xa) y del factor II activado (factor IIa) que la heparina.

Mas específicamente, la presente invención tiene por objeto las mezclas de polisacáridos sulfatados con la estructura general de los polisacáridos constitutivos de la heparina y con las siguientes características:

- tienen un peso molecular promedio de 1.500 a 3.000 daltones, una actividad anti-Xa de 100 a 150 UI/mg, una actividad anti-IIa de 0 a 10 UI/mg y una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 10,

- los polisacáridos constitutivos de las mezclas contienen 2 a 26 motivos sacarídicos y un motivo ácido glucurónico-4,5 no saturado 2-O-sulfato en uno de sus extremos,

bajo la forma de una sal de metal alcalino o alcalinoterroso.

Como sal de metal alcalino o alcalinoterroso, se prefiere las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio.

El peso molecular promedio se determina mediante cromatografía líquida alta presión utilizando 2 columnas en serie por ejemplo aquellas comercializadas bajo el nombre de TSK G3.000 XL y TSK G2.000 XL. Se realiza la detección mediante refractometría. El eluyente utilizado es el nitrato de litio y el caudal es de 0.6 ml/min. Se calibra el sistema con estándares preparados mediante fraccionamiento de la enoxaparina (AVENTIS) mediante cromatografía sobre gel de agarosa-poliacrilamida (IBF). Se realiza esta preparación mediante la técnica descrita por Barrowcliffe y coll., *Thromb. Res.*, 12, 27-36 (1977-78) o D.A. Lane y coll., *Thromb. Res.*, 12, 257-271 (1977-78) se obtiene los resultados con la ayuda del software GPC6 (Perkin Elmer).

Se mide la actividad anti-Xa mediante el método amidolítico sobre un sustrato cromogénico descrito por Teien y coll., *Thromb. Res.*, 10, 399-410 (1977), utilizando como patrón el primer patrón internacional de las heparinas de bajo peso molecular.

Se mide la actividad anti-IIa mediante la técnica descrita por Anderson L.O. y coll., *Thromb. Res.*, 15, 531-541 (1979), utilizando como patrón el primer patrón internacional de las heparinas de bajo peso molecular.

Preferiblemente, las mezclas tales y como descritas anteriormente presentan una actividad anti-Xa comprendida entre 125 y 150 UI/mg.

Más específicamente, las mezclas tales y como descritas anteriormente presentan una actividad anti-Xa comprendida entre 140 y 150 UI/mg y tienen un peso molecular promedio comprendido entre 2.000 y 3.000 daltones.

Preferiblemente, las mezclas según la invención tienen una actividad anti-IIa de 0 a 5 UI/mg.

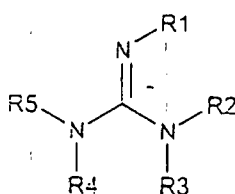
Todavía con más preferencia, las mezclas presentan una relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa superior a 25.

Las mezclas de polisacáridos según la invención se pueden preparar mediante despolimerización de una sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina en medio orgánico, por medio de una base orgánica fuerte de pKa superior a 20 o de imidazolato de sodio, transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada en sal de sodio, saponificación del éster y eventualmente purificación.

La sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina es preferiblemente la sal de benzetonio, cetilpiridinio o cetiltrimetilamonio.

La despolimerización se efectúa generalmente dentro de un disolvente orgánico inerte tal y como un disolvente clorado (diclorometano por ejemplo), el tetrahidrofurano, el anisol con una temperatura de -20°C a 40°C .

Como base orgánica fuerte de pka superior a 20, se puede utilizar el 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]des-5-eno, la 2-tert-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafósforina, las bases de la familia de la guanidina y de los fosfozenos.

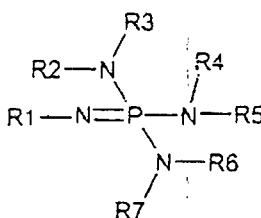


Las bases de la familia de las guanidinas son preferiblemente aquellas de fórmula: en la cual R_1 es hidrógeno o alquilo, $\text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4$ y R_5 idénticos o diferentes representan cada uno un radical alquilo.

Más específicamente, R_1 es hidrógeno y $\text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4$ y R_5 son radicales metilo.

Las bases orgánicas fuertes pertenecientes a la familia de los fosfazenos se definen por ejemplo según R. Schwesinger y coll., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987), R. Schwesinger y coll., Angew. Chem. 105, 1420 (1993).

Entre las bases de la familia de los fosfazenos se utiliza preferiblemente aquellas de fórmula:



En la cual los radicales R_1 a R_7 son idénticos o diferentes y representan radicales alquilo.

En las fórmulas anteriores, los radicales alquilo contienen 1 a 6 átomos de carbono en cadena alineada o ramificada.

Ventajosamente la relación en mol base orgánica fuerte de pka superior a 20 o imidazolato de sodio/sal de amonio cuaternario del éster bencílico de heparina está comprendida entre 0.2 y 5 y, preferiblemente, entre 1 y 4.

Más específicamente, la tasa de esterificación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina está comprendida entre el 50 y el 100%, y preferiblemente, entre el 70 y 90%. Esta tasa de esterificación corresponde al porcentaje molar de esterificación de los ácidos urónicos de la heparina.

Generalmente, la transformación de la sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina despolimerizada en sal de sodio se efectúa mediante tratamiento del medio de reacción con una solución alcohólica de acetato de sodio y, preferiblemente, con una solución al 10% de acetato de sodio en el metanol (peso/volumen), a una temperatura comprendida entre los 15 y los 25°C. El equivalente en peso de acetato agregado es preferiblemente 3 veces superior a la masa de sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina involucrada en la reacción de despolimerización.

Generalmente, la saponificación se efectúa mediante un hidróxido de metal alcalino tal y como la sosa, la potasa, el hidróxido de litio en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre 0 y 20°C y, preferiblemente, entre 0 y 10°C. Se utiliza de manera general de uno a 5 equivalentes molares de hidróxido de metal alcalino. Preferiblemente la saponificación se realizará en presencia de 2 a 3 equivalentes molares de hidróxido de metal alcalino.

Eventualmente, el producto final se puede purificar mediante cualquier método conocido de purificación de las heparinas despolimerizadas y especialmente según el método descrito en la patente EP 0037319. Preferiblemente, se purifica mediante el peróxido de hidrógeno, en medio acuoso, a una temperatura de 10 a 50°C. Preferiblemente, la anterior operación se realizará entre los 20 y 40°C.

La sal de amonio cuaternario del éster bencílico de la heparina se puede preparar según el siguiente esquema de reacción:

a) transformación de la heparina bajo la forma de sal de sodio por medio del cloruro de benzetonio para obtener el heparinato de benzetonio,

b) esterificación de la sal de benzetonio obtenida anteriormente mediante el cloruro de bencilo y tratamiento con una solución alcohólica de acetato de sodio para obtener la sal de sodio del éster bencílico de la heparina,

c) transalificación de la sal de sodio del éster bencílico de la heparina en sal de amonio cuaternario y, preferiblemente en sal de benzetonio, cetilpiridinio o cetiltrimetilamonio,

la reacción de la etapa a) se realiza en medio acuoso, mediante la acción del cloruro de benzetonio en exceso, sobre la heparina bajo la forma de sal de sodio, a una temperatura cercana a los 15 a 20°C ventajosamente la relación molar cloruro de benzetonio/heparina bajo la forma de sal de sodio está comprendida entre 2 y 3 y mas específicamente 2.5.

La heparina bajo la forma de sal de sodio de inicio utilizada es, preferiblemente una heparina de cerdo. Esta última puede ser previamente purificada para disminuir su tasa de dermatan sulfato que según el procedimiento descrito en la patente FR2663639.

La esterificación de la etapa b) se efectúa preferiblemente dentro de un disolvente orgánico clorado (cloroformo, cloruro de metileno por ejemplo), a una temperatura comprendida entre los 25 y 45°C y, preferiblemente, entre los 30 y los 40°C. Luego, se recupera el éster bajo la forma de sal de sodio mediante precipitación con acetato de sodio al 10% en peso/volumen en un alcohol tal y como el metanol. Generalmente, se utiliza 1 a 1.2 volumen de alcohol por volumen de medio de reacción. La cantidad de cloruro de bencilo y el tiempo de reacción se ajustan para obtener una tasa de esterificación comprendida entre el 50 y el 100% y, preferiblemente, entre el 70 y 90%. Preferiblemente, se utiliza 0.5 a 1.5 parte en peso del cloruro de bencilo por 1 parte en peso de la sal de benzetonio de la heparina. De la misma manera, preferiblemente, el tiempo de reacción estará comprendido entre 10 y 35 horas.

La transalificación de la etapa c) se efectúa mediante un cloruro de amonio cuaternario y, preferiblemente, mediante el cloruro de benzetonio, el cloruro de cetilpiridinio o el cloruro de cetiltrimetilamonio, en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre los 10 y 25°C. De manera ventajosa, la relación en mol cloruro de amonio cuaternario/sal de sodio del éster bencílico de la heparina está comprendido entre 2 y 3.

Las mezclas según la invención bajo la forma de sal de sodio se pueden transformar en otra sal de un metal alcalino o alcalinoterroso. Eventualmente, se pasa de una sal a la otra utilizando el método descrito en la patente US4168377.

Las mezclas según la invención no son tóxicas y así se pueden utilizar como medicamentos.

Las mezclas de la presente invención se pueden utilizar como agentes antitrombóticos. Especialmente, son útiles para la prevención de las trombosis venosas, los accidentes trombóticos arteriales, especialmente en el caso del infarto del miocardio. Generalmente son útiles para la prevención y tratamiento de la proliferación de las células musculares lisas, la angiogénesis y como agentes neuroprotectores de la arterosclerosis y la arteriosclerosis.

La presente invención se relaciona también con las composiciones farmacéuticas que contienen como principio activo una mezcla de polisacáridos según la invención eventualmente en asociación con uno o varios excipientes inertes.

Las composiciones farmacéuticas son por ejemplo soluciones inyectables por vía subcutánea o intravenosa. También son útiles por la vía pulmonar (inhalación).

La posología puede variar en función de la edad, el peso y el estado de salud del paciente. Para un adulto, generalmente está comprendida entre los 20 y 100 mg por día por vía intramuscular o subcutánea.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLO A: PREPARACIÓN DE LA SAL DE BENZETONIO DEL ESTER BENCILICO DE LA HEPARINA

Heparinato de benzetonio

A una solución de 10 g de heparina bajo la forma de sal de sodio en 100 ml de agua a una temperatura cercana a los 20°C, se agrega una solución de 25 g de cloruro de benzetonio en 125 ml de agua. Se filtra, se lava con agua y se seca el producto.

Ester bencilico de heparina (sal de sodio)

A una solución de 20 g de heparinato de benzetonio en 80 ml de cloruro de metileno, se agrega 16 ml de cloruro de bencilo. Se calienta la solución a una temperatura de 30°C durante 12 horas. Luego se agrega 108 ml de una solución al 10% de acetato de sodio en el metanol, se filtra, se lava con metanol y se seca. Se obtiene así 7.6 g de éster bencílico de heparina bajo la forma de sal de sodio cuya tasa de esterificación es del 77%.

Ester bencílico de heparina (sal de benzetonio).

En una matraz erlenmeyer A de 2 litros, se introduce 36 g (0.0549 mol) de éster bencílico de heparina (sal de sodio) y 540 ml de agua destilada. Después de homogenización a una temperatura cercana a los 20°C, se obtiene una solución color amarillo pálido. Bajo agitación magnética, se prepara en una matraz erlenmeyer B de 1 litro, una solución de 64.45 g (0.1438 mol) de cloruro de benzetonio y de 450 ml de agua. Se cuela la solución de la matraz erlenmeyer B en cerca de 35 minutos en la solución de la matraz erlenmeyer A bajo agitación. Se observa la formación de un precipitado blanco abundante. Se enjuaga la matraz erlenmeyer B con 200 ml de agua destilada y se introduce el agua del lavado en la matraz erlenmeyer A. Luego se detiene la agitación y se deja depositar la suspensión durante 12 horas. Se extrae y se separa la parte límpida del sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla), se agrega 560 ml de agua y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (560 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se realiza nuevamente 2 veces esta operación de lavado con cerca de 560 ml de agua destilada. En la primera operación de lavado, se deja el precipitado en suspensión y se filtra sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta con 4 veces 200 ml de agua destilada. Se escurre, luego se seca el sólido blanco húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 87.5 g de éster bencílico de heparina, sal de benzetonio. El rendimiento obtenido es del 94.9%.

EJEMPLO 1

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz erlenmeyer A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido tal y como se describe en el ejemplo

A. Después de disolución completa, se agrega 1.32 g (0.00948 mol) de 1,5,7-triazabicyclo [4.4.0]dec-5-eno. Se agita a una temperatura cercana a los 20°C, durante 3 horas y 30 minutos. Durante ese tiempo, se prepara a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado color amarillo gelatinoso casi traslucido. Se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante 1 hora. Se extrae y se saca la parte límpida del sobrenadante (62 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla color amarillo), se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (49 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida color amarillo oro con 2 veces 25 ml de metanol. Luego se escurre y se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 1.21 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 77.2%.

Saponificación:

En una matraz erlenmeyer de 25 ml, se introduce 1.21 g (0.0018 mol) de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente y 11 ml de agua. Bajo agitación magnética, se introduce 0.18 ml (0.0018 mol) de lejía de sosa al 30%. Después de adición, se enfría la mezcla a 4°C y se agita durante 2 horas. Se agrega 1.43 g de NaCl y se neutraliza la solución mediante adición de HCl a 1 mol/l (14 ml). Se trasvasa la mezcla en una matraz erlenmeyer de 100 ml y se agrega 52 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado color amarillo. Luego se detiene la agitación y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa el sobrenadante (44 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con un aspecto de papilla color amarillo), se agrega 25 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (21 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 25 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta obtenida color amarillo claro con 2 veces 10 ml de metanol. Se escurre y se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°

C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 0.66 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 60%.

Purificación:

En una matraz de 10 ml, se introduce 0.66 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 5.9 ml de agua destilada. Se lleva la mezcla a los 40° C bajo agitación magnética. Mediante adición de sosa a 0.1 mol/l, se lleva el pH entre 9 y 10 y se agrega 33 microlitros de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de agitar durante cerca de 2 horas, se agrega 0.65 g de cloruro de sodio. Luego se neutraliza la mezcla mediante la adición de HCl a 0.1 mol/l. Luego se filtra y se transvasa la solución en una matraz erlenmeyer de 25 ml. Se cuele 23.3 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado blanco. En este punto se detiene la agitación y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa el sobrenadante (5 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla), se agrega 5 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (5 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 5 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta blanca obtenida con 2 veces 5 ml de metanol. Se escurre y luego se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 0.51 g de una mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 77.2%.

Las características de esta mezcla son las siguientes:

Peso molecular promedio: 1.600 daltones

Actividad anti-Xa: 94 UI/mg

Actividad anti-IIa: < 0.1 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/ actividad anti-IIa : > 100

EJEMPLO 2

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz erlenmeyer A de 100 ml, se introduce 70 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 10 g (0.00595 mol) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido tal y como está descrito en el ejemplo A. Después de disolución completa, se agrega 1.7 ml (0.00587 mol) de 2-tertbutilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3,2-diazafosforina. A una temperatura cercana a los 20°C, se continúa la reacción durante cerca de 3 horas y 30 minutos. Mientras tanto, se prepara a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 30 g de acetato de sodio en 300 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado color amarillo gelatinoso casi traslucido. En este punto, se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante 1 hora. Se extrae y se separa la parte límpida del sobrenadante (204 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla color amarillo), se agrega 125 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (162 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 125 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado gelatinoso en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta gelatinosa obtenida color amarillo con 2 porciones de 63 ml de metanol. Se escurre y luego se seca el sólido gelatinoso bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 3.34 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 85.3%.

Saponificación:

Se saponifica 1.67 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el procedimiento de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.94 g de un polvo amarillo claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 61%.

Purificación:

Se purifica 0.94 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) anteriormente obtenida según el procedimiento de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.71 g de un polvo blanco. El rendimiento es del 75.5%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.500 daltones

Actividad anti-Xa: 146.6 UI/mg

Actividad anti-IIa: 2.15 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 68

EJEMPLO 3

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz erlenmeyer A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido según el ejemplo A. Después de disolución completa y enfriamiento a los 2°C, se agrega 0.333 g (0.00239 mol) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno. A una temperatura cercana a los 20°C, se continúa la reacción durante cerca de 3 horas y 30 minutos. Mientras tanto, se prepara a los 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Bajo agitación magnética se cuele la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado color amarillo. En este punto se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante 1 hora. Se extrae y se separa la parte límpida del sobrenadante (90 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla color amarillo), se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (61 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego, se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego, se lava la torta obtenida con 2 veces 25 ml de metanol. Luego, se escurre y se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 1.19 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El sólido es de color amarillo intenso. El rendimiento obtenido es del 75.9%.

Saponificación:

Se saponifica 1.19 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el procedimiento de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.78 g de un polvo color amarillo claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 71.5%

Purificación:

Se purifica 0.78 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) anteriormente obtenida según el método de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.58 g de un polvo blanco. El rendimiento es del 72.5%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.700 daltones

Actividad anti-Xa: 100.1 UI/mg

Actividad anti-IIa: 3.3 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 27:3

EJEMPLO 4

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matriz erlenmeyer A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de éster bencilico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido tal y como se describe en el ejemplo A. Después de disolución completa y a los 2°C, se agrega 0.06 ml (0.00222 mol) de 2-tert-butilimino-tris(dimetilamino) fosforano. A una temperatura cercana a 0°C, se continúa la reacción durante cerca de 3 horas y 30 minutos. Mientras tanto, se prepara a los 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado color amarillo gelatinoso casi traslucido. En este punto se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante 1 hora. Se extrae y se separa la parte límpida del sobrenadante (108 ml). Sobre el precipitado sedimentado (con aspecto de papilla

amarillenta), se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa el sobrenadante (60 ml). Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado blanco amarillento en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida con 2 veces 25 ml de metanol se escurre y se seca el sólido bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 1.22 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 77.8%.

Saponificación:

Se saponifica 1.22 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el protocolo de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.69 g de un polvo color amarillo muy claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 61.6%.

Purificación:

Se purifica 0.69 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) anteriormente obtenida según el protocolo de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.67 g de un polvo blanco. El rendimiento es de 97.1%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.900 daltones

Actividad anti-Xa: 145.2 UI/mg

Actividad anti-IIa: 4.5 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 32.6

EJEMPLO 5

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de heparinato de bencilo (tasa de esterificación:

180

77%, sal de benzetonio). Después de disolución completa y a 40°C, se agrega 0.95 g (0.00949 mol) de imidazolato de sodio. Al reflujo del diclorometano, la reacción sigue durante cerca de 4 horas. Mientras tanto, se para a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuela la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado gelatinoso casi traslúcido color amarillo. Luego, se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante una hora. Se extrae y se separa (88 ml) la parte límpida del sobrenadante color naranja. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla color naranja), se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa (51 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego, se filtra el precipitado color naranja en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida con 2 veces 25 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de secar durante 12 horas, se obtiene 1.34 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 76.6%.

Saponificación:

Se saponifica 1.2 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el protocolo de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.63 g de un polvo color beige. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 52.5%.

Purificación:

Se purifica 0.63 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) anteriormente obtenida según el método de purificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 0.42 g de un polvo color blanco beige. El rendimiento es del 66.7%.

La mezcla purificada de polisacáridos (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.250 daltones

Actividad anti-Xa: 134.5 UI/mg

Actividad anti-IIa: 1.5 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 90.5

EJEMPLO 6

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En una matraz erlenmeyer A de 50 ml, se introduce 28 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 4 g (0.00238 mol) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenidos tal y como se describe en el ejemplo A. Después de disolución completa, se agrega 1.33 g (0.00956 mol) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno. Se agita a una temperatura cercana a los 20°C durante 3 horas y 30 minutos. Mientras tanto, se prepara a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 12 g de acetato de sodio en 120-ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuele la mezcla de reacción de la matraz erlenmeyer A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso casi traslucido. En este punto se detiene la agitación y se deja decantar la suspensión durante una hora. Se extrae y se separa (56 ml) la parte límpida del sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se agrega 60 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 30 minutos. Se extrae y se separa (70 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 50 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida color amarillo oro con 2 veces 50 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de 12 horas de secado, se obtiene 0.92 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 64%.

Saponificación:

En una matraz erlenmeyer de 25 ml, se introduce 0.97 g (0.0014 mol) de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) obtenida anteriormente y 17.5 ml de agua. Bajo agitación magnética, se introduce 0.38 ml (0.00379 mol) de legía de sosa al 30%. Después de adición, se mantiene la mezcla a una temperatura cercana a los 20°C y se agita durante 5 horas. Se agrega 1.8 g de NaCl y se neutraliza la solución mediante adición de HCl concentrado (volumen final de la solución cerca de 18 ml). Se transvasa la mezcla en una matraz erlenmeyer de 100 ml y se agrega 46 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado color amarillo. En este punto se detiene la

agitación y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa 52 ml el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se agrega 25 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de una hora. Se extrae y se separa (27 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 25 ml de metanol y se agita durante cerca de una hora. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 4. Luego se lava la torta obtenida con 2 veces 10 ml de metanol. Luego se escurre y se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C después de secar durante 3 horas, se obtiene 0.42 g de heparina despolimerizada bruta (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 45.6%.

Purificación:

En una matraz de 10 ml, se introduce 0.42 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 3.8 ml de agua destilada. Se lleva la mezcla a los 38°C bajo agitación magnética. Mediante adición de sosa a 0.1 mol/l, se lleva el pH entre 9 y 10 y se agrega 25 microlitros de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de agitar durante cerca de 2 horas y 30 minutos, se agrega 0.5 g de cloruro de sodio. Luego, se neutraliza la mezcla mediante adición de HCl a 0.1 mol/l. Luego se filtra y se transvasa la solución en una matraz erlenmeyer de 25 ml. Se cuele 11.3 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado blanco. En este punto se detiene la agitación y se deja sedimentar la suspensión durante 12 horas a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa (9.8 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla), se agrega 5 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 3 horas. Se extrae y se separa (6.2 ml) el sobrenadante.

Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 5 ml de metanol y se agita durante 20 minutos. Luego se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta blanca obtenida con 2 veces 5 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de cerca de 2 horas y 20 minutos de secado, se obtiene 0.39 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 92.8%.

Las características de la heparina despolimerizada así obtenida son las siguientes:

Peso molecular promedio: 1.950 daltones

Actividad anti-Xa: 115.6 UI/mg

Actividad anti-IIa: < 2 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: >57

EJEMPLO 7

Despolimerización y transformación en sal de sodio:

En un reactor A de 400 ml, se introduce 140 ml de diclorometano. Bajo agitación, se carga lentamente 20 g (0.0119 mol) de éster bencílico de heparina (tasa de esterificación: 77%, sal de benzetonio) obtenido tal y como se describe en el ejemplo A. Después de disolución completa, se mide el porcentaje en agua del medio de reacción mediante el método de Karl Fisher. El valor obtenido es de 0.1% de agua. Luego, se agrega 3.5 ml (0.0121 mol) de 2-tert-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3,2-diazafosforina. A una temperatura cercana a los 25°C, sigue la reacción durante cerca de 24 horas. Mientras tanto, se prepara a 4°C en una matraz erlenmeyer B, una solución de 30 g de acetato de sodio en 300 ml de metanol. Bajo agitación magnética, se cuele la mitad de la mezcla de reacción del reactor A en la solución metanólica de acetato de sodio. Aparece un precipitado amarillo gelatinoso casi translúcido. Se mantiene la agitación durante una hora y se deja decantar la suspensión durante cerca de 12 horas a 4°C. Se extrae y se separa (220 ml) la parte límpida del sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado (aspecto de papilla amarilla), se agrega 220 ml de metanol y se agita durante 50 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 40 minutos. Se extrae y se separa (204 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 204 ml de metanol y se agita durante 40 minutos. Luego se filtra el precipitado gelatinoso en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta gelatinosa amarilla obtenida con 2 porciones de 100 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido gelatinoso bajo presión reducida (2.7 kPa), a una temperatura cercana a los 60°C. Después de cerca de 12 horas de secado, se obtiene 2.6 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 70.6% (calculado sobre la base de la mitad del medio de reacción tratado).

Saponificación:

Se saponifica 2.6 g de heparina despolimerizada (éster de bencilo, sal de sodio) anteriormente obtenida según el procedimiento de saponificación descrito en el ejemplo 1. Se obtiene 1.48 g de un polvo color amarillo claro. El rendimiento en heparina despolimerizada bruta (sal de sodio) es del 62.9%.

Purificación:

En una matraz erlenmeyer de 50 ml, se introduce 1.48 g de heparina despolimerizada bruta obtenida anteriormente y 15 ml de agua destilada. Se lleva la mezcla a los 40°C bajo agitación magnética. Mediante adición de sosa a 1 mol/l, se lleva el pH entre 9 y 10. Se filtra la solución sobre una membrana filtrante con una porosidad de 1 µm. Luego se agrega 76 microlitros de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de agitar durante cerca de 2 horas, se agrega 1.5 g de cloruro de sodio. Luego se neutraliza la mezcla mediante la adición de HCl a 1 mol/l. Se filtra la solución sobre una membrana filtrante con una porosidad de 1 µm. Se cuela 38 ml de metanol. Se observa la formación de un precipitado blanco. En este punto se detiene la agitación y se deja sedimentar la suspensión durante una hora a una temperatura cercana a los 20°C. Luego se extrae y se separa (37 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado, se agrega 37 ml de metanol y se agita durante 45 minutos. Se deja sedimentar nuevamente el precipitado durante cerca de 45 minutos. Se extrae y se separa (34 ml) el sobrenadante. Sobre el precipitado sedimentado, se agrega 34 ml de metanol y se agita durante 15 minutos. Luego, se filtra el precipitado en suspensión sobre vidrio sinterizado 3. Luego se lava la torta blanca obtenida con 2 veces 25 ml de metanol. Se escurre luego se seca el sólido húmedo bajo presión reducida (2.7 kPa) a una temperatura cercana a los 60°C. Después de secar durante 12 horas, se obtiene 1.29 g de heparina despolimerizada pura (sal de sodio). El rendimiento obtenido es del 87.2%.

La heparina despolimerizada purificada (sal de sodio) obtenida presenta las siguientes características:

Peso molecular promedio: 2.250 daltones

Actividad anti-Xa: 149.6 UI/mg

Actividad anti-IIa: 0.85 UI/mg

Relación actividad anti-Xa/actividad anti-IIa: 176

Oligosaccharide Mapping of Low Molecular Weight Heparins: Structure and Activity Differences

Robert J. Linhardt,*† Duraikkannu Loganathan,† Ali Al-Hakim,† Hui-Ming Wang,† Jeanine M. Walenga,† Debra Hoppensteadt,† and Jawed Fareed†

Division of Medicinal and Natural Product Chemistry, College of Pharmacy, The University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242, and Departments of Pathology and Pharmacology, Loyola University Medical Center, Maywood, Illinois 60153.
Received October 10, 1989

Low molecular weight heparins from a variety of commercial sources were examined. These had been prepared by several methods including peroxidative cleavage, nitrous acid cleavage, chemical β -elimination, enzymatic β -elimination, and chromatographic fractionation. The molecular weight and polydispersity of these low molecular weight heparins showed greater differences than were observed for typical commercial heparin preparations. Considerable differences were also observed in the antithrombin III mediated anti factor Xa activity, the heparin cofactor II mediated antifactor IIa activity, and the USP activity of these low molecular weight heparins. An oligosaccharide-mapping technique (comparable to the peptide mapping of proteins) was applied to these low molecular weight heparins in an effort to understand the structural features responsible for their activity differences. Heparin lyase from *Flavobacterium heparinum* was first used to depolymerize the low molecular weight heparin into its constituent oligosaccharides. The oligosaccharides present in the resultant mixture were identified and quantitated by using standard oligosaccharides of defined structure on gradient polyacrylamide gel electrophoresis and strong anion exchange high pressure liquid chromatography. Six of the oligosaccharide products have been identified and represent nearly 90 wt % of heparin's mass. Even though all the low molecular weight heparins showed these six oligosaccharide components, their content in each varied greatly, accounting for 20 to over 90% of their mass. The antithrombin III mediated anti factor Xa activities of the low molecular weight heparins correlated only poorly to the concentration of a hexasaccharide containing a portion of heparin's antithrombin III binding site. The heparin cofactor II mediated antifactor IIa activity, however, could not be correlated to these six oligosaccharides of known structure nor to the molecular weight or charge density of these low molecular weight heparins. The low molecular weight heparins prepared by different methods each showed a new distinctive oligosaccharide in their maps. Their isolation and structural characterization, which included two-dimensional NMR and fast atom bombardment mass spectrometry, indicated that these unusual oligosaccharides result from end-sugar modification during chemical depolymerization. Both gel electrophoresis and high-pressure liquid chromatography mapping techniques showed a greater structural diversity between low molecular weight heparins than had previously been observed between similarly analyzed commercial heparins.

Heparin is a polydisperse (M_n 5000-40000, M_w (av) 14000¹), highly sulfated, alternating copolymer of 1 $\rightarrow$ 4 linked glucosamine and hexuronic acid and has been used over the last half-century as an anticoagulant.² Heparin exhibits undesirable side effects, such as hemorrhagic complications,³ and thus while heparin is in widespread clinical use it has been cited as the drug most responsible for death in otherwise healthy patients.⁴ Low molecular weight (LMW) heparins have recently been introduced as heparin substitutes and are claimed to have reduced side effects (a higher safety/efficacy ratio), more predictable pharmacological action, sustained antithrombotic activity, and better bioavailability.⁵ These potential advantages have led to the development of several commercial LMW heparin preparations.

LMW heparin is prepared, in low yield, by size fractionation or in higher yield by the partial, controlled depolymerization of heparin. Fraxiparin (CY216) is obtained by the fractionation of commercial porcine mucosal heparin. CY222 and Fragmin (KABI 2165) are both prepared by partial nitrous acid depolymerization of porcine mucosal heparin.⁶ RD heparin and Fluxum (OP 2123) are prepared from the oxidative cleavage of porcine mucosal and bovine mucosal heparins, respectively.⁷ Enoxaparin (PK 10169) is obtained by benzylation followed by β -elimination and alkaline hydrolysis.⁸ Logiparin (LHN-1) is obtained by heparin lyase catalyzed partial β -eliminative depolymerization of porcine heparin.⁹ A LMW heparin standard, prepared by partial nitrous acid depolymerization, has been introduced by the National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC, London, England) under

Table I. Ash Content and Degree of Sulfation of LMW Heparins

sample	percent ash	degree of sulfation ^a
tetrasaccharide standard 7	39.1	3.00
Hep A Forc hep	31.4	2.41
Hep B CY216	22.0	1.75
Hep C CY222	29.3	2.29
Hep D Kabi 2165	28.9	2.22
Hep E OP2123	20.3	1.55
Hep F RD heparin	34.7	2.68
Hep G PK10169	29.5	2.26
Hep H LHN-1	12.9	0.99
Hep J NIBSC	33.9	2.60

^aDegree of sulfation is the number of sulfate groups per disaccharide unit. The heparin tetrasaccharide (oligosaccharide 7 in Table IV) is salt-free and has six sulfate groups. It was used to calculate the degree of sulfation of the LMW heparins. The salt content of the LMW heparins was <7 wt % by conductivity with F, G, and C having the highest conductivity. This could result in our overestimating the degree of sulfation by 9-10% for these three LMW heparins.

the auspices of the World Health Organization (WHO, Geneva, Switzerland).¹⁰

- (1) Laurent, T. C.; Tengblad, A.; Thunberg, L.; H36k, M.; Lindahl, U. *Biochem. J.* 1978, 175, 691.
- (2) Linhardt, R. J.; Loganathan, D. In *Biomimetic Polymers*; Gebel, G., Ed.; Plenum: New York, 1989; in press.
- (3) Gervin, A. S. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1975, 140, 289.
- (4) Porter, J.; Harshel, J. *JAMA* 1977, 237, 9.
- (5) Breddin, H. K.; Fareed, J.; Bender, N. *Haemostasis* 1988, 18, 1.
- (6) Shively, J. E.; Conrad, H. E. *Biochemistry* 1976, 15, 3932.
- (7) Fuest, F. U.S. Patent 4,281,108, July 28, 1981.
- (8) Mardigian, J. U.S. Patent 4,440,926, April 3, 1984.
- (9) Linhardt, R. J.; Grant, A.; Cooney, C. L.; Langer, R. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 7310.

*To whom all correspondence should be directed.

†The University of Iowa.

†Loyola University Medical Center.

Table II. Molecular Weight and Dispersity of LMW Heparins

sample	molecular weight by GPC-HPLC ^a		polydispersity by GPC-HPLC ^a	molecular weight by gradient page ^b
	wt av	no. av		
Hep B CY216	5508	4626	1.180	4470
Hep C CY222	3410	2529	1.348	3160
Hep D Kabi 2165	6370	5293	1.181	6100
Hep E OP2123	6511	4922	1.323	6610
Hep F RDhep	6221	4567	1.362	8480
Hep G PK10169	3789	2823	1.342	4170
Hep H LHN1	4850	3561	1.362	6100

^a Molecular weight data was obtained from ref 12. ^b Molecular weight was estimated from a plot of log M_r vs migration distance with use of the partially depolymerized bovine heparin ladder of bands (Figure 2, lane I). A correlation of $r = 0.99$ was obtained between $M_r = 1000$ and 10000. Porcine heparin and bovine heparin (a) (Figure 1, lanes A and I) had molecular weights estimated at 17380 and 11220, respectively.

Recent comparative biochemical and pharmacological studies of these LMW heparins have clearly demonstrated that these are not biologically equivalent products.^{11,12} This study probes the chemical differences between LMW heparins by using the recently developed technique of oligosaccharide mapping.^{13,14} Two oligosaccharides with unique sequences are isolated from these LMW heparins and their structures characterized. These unusual sequences represent artifacts introduced in the depolymerization process and may play a role in the biological activity of a particular LMW heparin.¹⁵

Results

The LMW heparins studied represented bulk drug preparations and thus were initially assessed for ash content (Table I). The ash content of the LMW heparins ranged from 12.9 to 34.7 wt %. In addition, the ash content of a pure, salt-free, hexasulfated tetrasaccharide having a molecular formula $C_{24}H_{31}O_{23}N_5S_6Na_6$ was determined to be 39.1%. On the basis of the ash content of this standard and its three sulfates per disaccharide unit, the degree of sulfation of each LMW heparin was estimated. The LMW heparins all contained <7 wt % salt as measured by conductivity using a potassium chloride standard curve, with LMW heparins F, G, and C having the greatest conductivity.

The molecular weight and dispersity of each LMW was measured by using gel permeation HPLC using UV detection and are presented in Table II. Molecular weights were verified by viscometry¹⁶ and by gradient polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Figure 1). Gradient PAGE not only provides both an estimate of molecular weight and dispersity (Table II) but also, because it is a high-resolution technique, gives information on the presence and distribution of oligomer and polymer chains of defined length or degree of polymerization (dp).

A B C D E F G H I



Figure 1. Stained gradient polyacrylamide gel of intact heparins and LMW heparins. Lanes contain the following (100 μ g): A, Hep A porcine mucosal PM18885; B, LMW-Hep B, CY216; C, LMW-Hep C, CY222; D, LMW-Hep D, Kabi 2165; E, LMW-Hep E, OP2123; F, LMW-Hep F, RD heparin; G, LMW-Hep G, PK10169; H, LMW-Hep H, LHN-1; and I, Hep-1 bovine lung 16F0188.

Table III. Activity of LMW Heparins

sample	HClI-mediated antifactor IIa: IC ₅₀ , μ g/mL	ATIII-mediated ^a antifactor Xa, units/mg	USP activity, ^b units/mg
Hep A porc	1.5	172	148
Hep B CY216	44.6	95	45
Hep C CY222	50.0	58	28
Hep D Kabi 2165	17.0	142	75
Hep E OP2123	19.0	82	80
Hep F RD heparin	28.7	60	72
Hep G PK10169	50.0	93	55
Hep H LHN-1	19.0	86	78
Hep I bov (b)	nd	155	160

^a Antifactor Xa activity was measured against NIBSC LMW heparin standard. Data from ref 12. ^b USP activity was measured against the USP K-1 standard heparin. Data from ref 12.

The antithrombin III (ATIII) mediated antifactor Xa activity of each LMW heparin (measured on a relative basis against the NIBSC LMW heparin standard) and the USP activity (measured against USP K-1 heparin standard) have been previously reported^{11,12} and are presented in Table III along with the their heparin cofactor II (HClI) mediated antifactor IIa activities. Since a heparin (or LMW heparin) standard having defined HClI mediated antifactor IIa unitage is not available, we have chosen instead to express this activity in terms of an IC₅₀ value¹⁷ (Table III).

The LMW heparins were each depolymerized with heparin lyase and oligosaccharide maps were constructed by using gradient PAGE and strong anion exchange (SAX) HPLC (Figures 2 and 3). Components within each map were identified and their concentrations were measured

- (10) Barrowcliffe, T. W.; Curtis, A. D.; Tomlinson, T. D.; Hubbard, A. R.; Johnson, E. A.; Thomas, D. P. *Thromb. Haemostas* 1988, 54, 676.
- (11) Fareed, J.; Walenga, J. M.; Racanelli, A.; Hoppensteadt, D.; Huan, X.; Messmore, H. L. *Haemostas* 1988, 18, 33.
- (12) Fareed, J.; Walenga, J. M.; Hoppensteadt, D.; Huan, X.; Racanelli, A. *Haemostas* 1988, 18, 3.
- (13) Rice, K. G.; Rottink, M. K.; Linhardt, R. J. *Biochem. J.* 1987, 244, 515.
- (14) Linhardt, R. J.; Rice, K. G.; Kim, Y. S.; Lohse, D. L.; Wang, H. M.; Loganathan, D. *Biochem. J.* 1988, 254, 781.
- (15) Larsen, A. K.; Linhardt, R. J.; Rice, K. G.; Wogan, G.; Langer, R. J. *Biol. Chem.* 1989, 264, 1570.
- (16) Hoppensteadt, D.; Masters Thesis, Loyola University Medical Center, 1989.

- (17) Kim, Y. S.; Linhardt, R. J. *Thromb. Res.* 1989, 53, 65.

Table IV. Oligosaccharide Components of LMW Heparins

sample	μg of oligosaccharide/100 μg of heparin ^{a,c}							total of oligosaccharides in $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ of heparin ^b
	1	2	4	5	7	8	9	
Hep A porc hep	1.12	22.39	3.20	8.93	10.60	-	3.83	81.07
Hep B CY216	1.00	22.51	1.28	8.69	5.61	-	3.27	45.34
Hep C CY222	0.66	10.88	2.78	2.51	2.84	-	2.24	21.26
Hep D KABI2165	0.95	29.27	4.60	7.09	11.01	-	7.30	60.21
Hep E OP2123	1.95	93.08	5.42	7.80	8.36	1.50	1.04	68.96
Hep F RD heparin	1.60	50.90	9.82	15.93	19.91	-	4.76	102.31
Hep G PK10169	1.62	40.14	2.06	24.98	12.00	2.60	5.27	88.55
Hep H LHN-1	2.60	55.03	6.39	16.36	17.62	2.08	5.18	105.12

^aOligosaccharides structures are as follows: 1, $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}$; 2, $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}$; 4, $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}$; 5, $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}$; 7, $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}$; 8, $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}3\text{S}6\text{S}$; and 9, $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}3\text{S}6\text{S}$. ^bHeparin content determined by carbazole assay; ref 29. ^cThe assignments of oligosaccharide 8 in Hep G and Hep H and 9 in Hep F are based on coelution of the peak with standard samples.

A B C D E F G H I

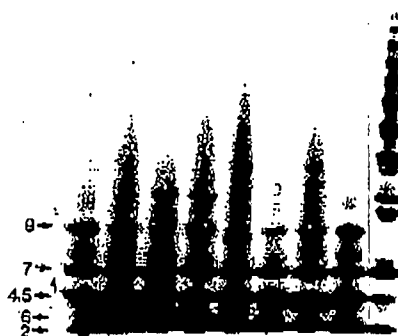


Figure 2. Stained gradient polyacrylamide gel showing oligosaccharide maps of heparin lyase depolymerized heparins and LMW heparins. Lanes contain the following (100 μg): A, Hep A porcine mucosal PM16885; B, LMW-Hep B, CY216; C, LMW-Hep C, CY222; D, LMW-Hep D, Kabi2165; E, LMW-Hep E, OP2123; F, LMW-Hep F, RD heparin; G, LMW-Hep G, PK10169; and H, LMW-Hep H, LHN-1. Lane I contains partially (80%) depolymerized Hep-I bovine lung (a) 16F0188, the major bands in this lane correspond to repeating trisulfated disaccharide oligomers ranging from dp 2 (M, 656) to dp 30 (M, 9975).

by SAX-HPLC against standard curves generated by using defined oligosaccharide standards (Table IV). Major and previously unidentified peaks were observed in the SAX-HPLC chromatograms of heparin lyase depolymerized LMW heparins prepared with use of nitrous acid and LMW heparins prepared by oxidative depolymerization (Figures 2 and 3). These components were isolated and purified, and their structures were examined by using 600-MHz ^1H NMR and fast atom bombardment (FAB) mass spectral methods (see Experimental Section). Together with the known specificity of heparin lyase¹⁸ and

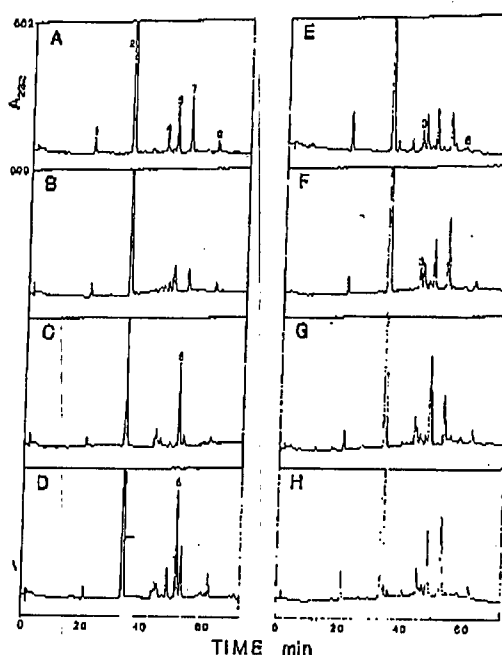


Figure 3. SAX-HPLC oligosaccharide maps of heparin lyase depolymerized heparin and LMW heparins: A, Hep A porcine mucosal PM16885; B, LMW-Hep B, CY216; C, LMW-Hep C, CY222; D, LMW-Hep D, Kabi2165; E, LMW-Hep E, OP2123; F, LMW-Hep F, RD heparin; G, LMW-Hep G, PK10169; and H, LMW-Hep H, LHN-1. Peaks are labeled which correspond to oligosaccharides 1-8.

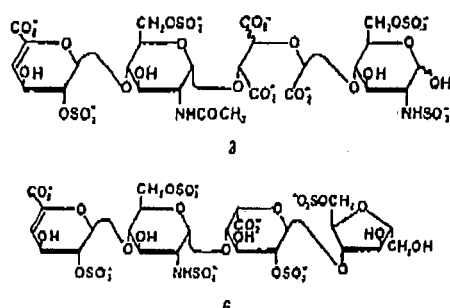
the known chemistry of the nitrous acid⁹ and oxidative⁷ depolymerization reactions this spectral data establishes structure 6 for the unusual product resulting from nitrous acid cleavage. The oligosaccharide arising from oxidative cleavage could not be rigorously established owing to its instability, and a tentative structure 3 for the oligosaccharide is proposed.

The ATIII-mediated antifactor Xa activity of each LMW heparin correlated only poorly with the number of AT III binding sites in each preparation calculated from the oligosaccharides containing the characteristic^{19,20} 2-deoxy-2-sulfamino- $\alpha\text{-D-glucopyranose}$ 3,6-disulfate residue.

(19) Lindahl, U.; Backström, G.; Thunberg, L. *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 9926.

(20) Atha, D.; Stephens, A. W.; Rosenberg, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1984, 81, 1030.

(18) Rice, K. G.; Linhardt, R. J. *Carbohydr. Res.* 1989, 190, 219-233.



The HCII-mediated activity of the LMW heparins failed to correlate to the concentration of any of the six oligosaccharides of known structure seen in the SAX-HPLC maps (Figure 3). Neither the molecular weight (Table II) nor the degree of sulfation (Table I) of the LMW heparins correlated to the HCII-mediated anti factor IIa activity (Table III).

Discussion

LMW heparin was recently introduced as a heparin substitute.⁶ Clinical studies using LMW heparin in a variety of medical applications continue to demonstrate both its efficacy as an antithrombotic agent and its decreased toxic side effects compared to the parent drug, unfractionated heparin.⁶ Size fractionation of commercial (glycosaminoglycan) heparin (M_n 5000–40 000, M_w (av) 14 000) results in a LMW heparin having the characteristics of heparin with reduced molecular weight. This LMW heparin (M_n 5000–8000) represents less than 15 wt % of the commercial product,¹⁷ making this approach to preparing LMW heparin unprofitable. A more practical approach to preparing LMW heparin is to reduce the average molecular weight of heparin by partial chemical or enzymatic depolymerization. Manufacturers have approached this depolymerization by using several different methods including (1) deaminative cleavage at N-sulfated glucosamine residues using nitrous acid followed by reduction of the resulting anhydromannose reducing end sugar;⁶ (2) oxidative cleavage of heparin at the free vicinal diol functionality present in unsulfated glucuronic and iduronic acid residues;⁷ and (3) eliminative cleavage either enzymatically at the glycosidic linkage between a 2-sulfated glucosamine residue and 2-sulfated iduronic acid,¹⁸ or chemically by first forming the benzyl ester of iduronic acid followed by base-catalyzed β -elimination and hydrolysis.⁶ Recent studies have demonstrated the bioinequivalence of LMW heparin preparations.^{11,12}

Analysis of the intact LMW heparins (Table I) indicates that there are substantial differences in their residual ash content. Since the samples showed similar conductivities and were each dried under uniform conditions to obtain a consistent water content, the difference in their ash content is primarily attributable to the different relative degree of sulfation of these LMW heparins. The weight and number average molecular weights and dispersity of the LMW heparins also showed marked variability (Table II). The use of high-resolution gradient PAGE revealed a remarkable level of variation in the presence and distribution of polymer chains of defined dp (Figure 1). These data confirm the differences in the molecular weight and polydispersity of LMW heparins and clearly demonstrate the chemical inequivalence of commercial LMW heparins. While the data shown in Tables I and II and Figure 1 measure the physical-chemical properties of the LMW heparins, they do not permit the correlation of differences in any specific structural feature or features to the bio-

inequivalence of these preparations (Table III).

Oligosaccharide mapping of these LMW heparins was undertaken to obtain the structural information necessary to begin to establish a structure-activity relationship. Oligosaccharide mapping of acidic polysaccharides is an approach comparable to the peptide mapping of proteins.^{13,14} LMW heparin is first depolymerized enzymatically and then fractionated by either using gradient PAGE or SAX-HPLC. By use of standard oligosaccharides, specific sequences within the polymeric substrate can be identified and quantitated. The results of mapping these LMW heparins are given in Figures 2 and 3 and Table IV. We had previously reported that for commercial heparins, ATIII affinity fractionated heparins, and charge-fractionated heparins the concentrations of ATIII binding sites, present within a heparin preparation, correlates to its ATIII mediated antifactor Xa activity.^{14,17} Although a similar relationship was observed in this study for LMW heparins, a poor correlation was observed, possibly due to the narrow range of the activities.^{14,17} We had previously reported that the HCII-mediated antifactor IIa activity of heparin fractionated by ion-exchange chromatography or HCII-affinity chromatography, correlated well with their degree of sulfation, their molecular weight, and their content of fully sulfated oligosaccharides 2, 7, and 8.¹⁷ The HCII-mediated antifactor IIa activity of LMW heparins, however, only poorly correlated to the relative concentration of oligosaccharide sequences having a high level of sulfation ($RS = [2 + 7 + 8]/[1 + 4 + 5 + 8 + 9]$). LMW heparins D, E, F, and H have an $RS > 0.67$ while LMW heparins B, C, and G have an $RS < 0.63$. Neither the degree of sulfation, as determined from ash content (Table I), nor the molecular weight (Table II) of the LMW heparins correlated to the HCII mediated antifactor IIa activity.

One unusual feature of the oligosaccharide maps of LMW heparins (not previously observed in commercial heparins¹⁴) is the presence of major unidentified oligosaccharides (Figures 2 and 3). We postulated that these might be the result of a chemical modification in the heparin introduced during the depolymerization reaction. The unidentified oligosaccharide formed in the nitrous acid depolymerized products accounted for 120 nmol/mg of the total oligosaccharide mixture. The nanomoles of this product is approximately 40% of the nanomoles of LMW heparin C, consistent with this unidentified oligosaccharide arising from the reducing end of each polymer chain formed during nitrous acid depolymerization. Fast atom bombardment mass spectral analysis (FAB-MS) of this oligosaccharide showed a distinct molecular ion at m/z 1190 consistent with a pentasulfated tetrasaccharide.

Analysis of the 600-MHz ^1H NMR spectrum revealed that the nonreducing end sugar residue is Δ UA2S (4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid) as shown by the olefinic proton signal at 5.99 ppm and an anomeric proton signal at 5.51 ppm. The other two anomeric proton signals seen at 5.44 and 5.19 ppm could be assigned to the internal disaccharide, $\rightarrow$ 4)- α -D-GlcN2S6S(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-IdoA2S (1 $\rightarrow$ (IdoA, iduronic acid)).²¹ The presence of only three anomeric proton resonances and only one H-2 resonance at 3.31 ppm, assignable to the internal 2,6-disulfated glucosamine, suggested that the reducing end sugar is ring contracted. Structure 6 was proposed on the basis of these NMR and mass spectral data and consistent with both the specificity of heparin

(21) Merchant, Z. M.; Kim, Y. S.; Rice, K. G.; Linhardt, R. J. *Biochem. J.* 1985, 229, 369.

Oligosaccharide Mapping of Low Molecular Weight Heparins

lyase¹⁸ and the known chemistry of nitrous acid depolymerization of heparin.^{9,22} Two-dimensional homonuclear correlated spectroscopy (COSY) (not shown) confirmed the structure 6. Starting from the olefinic proton signal (5.99 ppm) of the nonreducing end, ΔUA2S, all proton resonances of this residue are easily identified as follows: 4.32 (H-3), 4.62 (H-2), and 5.51 (H-1) ppm. These data are consistent with those reported for ΔUA2S residues of oligosaccharides prepared by heparin lyase depolymerization.^{21,25} The anomeric proton resonance (5.44 ppm) of the internal GlcN2S6S residue showed connectivity to the H-2 resonance at 3.31 ppm which in turn showed cross-peaks with the H-3 resonance at 3.65 ppm, confirming that the C-3 position is unsulfated. The coupling network of the internal IdoA2S residue was also easily identifiable and led to the following assignment: 5.19 (H-1), 4.30 (H-2), 4.21 (H-3), 4.16 (H-4), and 4.61 (H-5) ppm. Finally the signals of the reducing end were identified beginning with the H-1 and H'-1 signals seen at 3.71 and 3.77 ppm, respectively. Both of these signals showed cross-peaks with the H-2 resonance at 4.00 ppm that in turn showed connectivity to the H-3 resonance at 4.13 ppm, confirming that the C-3 position bears a free hydroxyl group. These data are comparable to those reported for a similar ring-contracted tetrasaccharide prepared by nitrous acid depolymerization of bovine lung heparin.²² It is, however, unusual that the ring-contracted anhydromannose reducing end is found primarily in a single oligosaccharide component. This result suggests selectivity of nitrous acid toward certain 2,6-disulfated glucosamine residues within the heparin polymer. The unexpected selectivity of this reagent requires additional study on structurally defined substrates.

The unidentified oligosaccharide formed in the oxidative depolymerization of heparin occurred in 18% of the chains, representing a somewhat lower amount than anticipated from the molar concentration of the LMW heparin from which it was derived. This suggests that less than half of the LMW heparin chains carry the sequence contained in this unidentified oligosaccharide. Several attempts to unambiguously establish the structure of this oligosaccharide failed. An oligosaccharide having four to five sulfate groups was isolated by SAX-HPLC in 1.3% yield. The expected yield was 4% based on analytical SAX-HPLC. This component ran true when reanalyzed by SAX-HPLC and gave a band on gradient PAGE analysis running slightly ahead of a pentasulfated tetrasaccharide standard (4 in Table IV). High-field NMR analysis on 800 μg of sample required that it be held at room temperature for 1 h. The spectrum showed the sample to be a complex mixture. Appearance of signals of a major component at 5.99 and 5.51 ppm indicated that its nonreducing end sugar was ΔUA2S and a signal at 2.05 ppm was attributed to the protons of the methyl group of an N-acetylated glucosamine residue. Reanalysis of this sample by SAX-HPLC confirmed that it had decomposed. Many minor products were observed in addition to a predominant, unsaturated disulfated disaccharide. The low recovery of 3 by SAX-HPLC had also suggested that decomposition was taking place. A tentative structure for oligosaccharide 3 is proposed on the basis of the NMR data which is consistent with the specificity of heparin lyase,²⁴ the mechanism of

Journal of Medicinal Chemistry, 1990, Vol. 33, No. 6 1643

oxidative cleavage of uronic acid residues present in heparin,¹⁴ the instability of this oligosaccharide and its breakdown to an unsaturated disulfated disaccharide.

LMW heparins prepared by either enzymatic or chemical β-eliminative cleavage contain unsaturated uronic acid at their reducing end as demonstrated by an absorbance maxima at 292 nm in the intact LMW heparin (Table I). The presence of this unusual sugar residue, in the drug, may act to block its biotransformation in vivo (as has been reported for oligosaccharides having this same structural feature¹³) slowing its rate of clearance. Similarly, the effect of altered reducing ends, now established to be present in LMW heparins prepared through nitrous acid depolymerization, on in vivo biotransformation needs to be examined.

In conclusion, this study demonstrates that commercial LMW heparins are not chemically equivalent. The differences are primarily the result of the chemical or enzymatic process used in their depolymerization. The chemical inequivalence of these preparations results in different molecular weights, degrees of sulfation, and oligosaccharide maps. These altered physical-chemical properties affect the anticoagulant activities of LMW heparins making them bioinequivalent. Finally, all the LMW heparins prepared by chemical or enzymatic depolymerization contain certain modified sugar residues, at either their reducing or non-reducing ends. The effect of these modified sugars on the biological activities of the various LMW heparins requires additional investigation.

Experimental Section

Materials. Low molecular weight heparins obtained as bulk drug from the manufacturers included Fraxiparin, CY216 (lot no. CY 216A) and CY222 (lot no. PII WH), Choay Laboratories, Paris, France; Fragmin, KABI 2165 (lot no. DXN 75), KabiVitrum, Stockholm, Sweden; Fluxum OP 2123 (lot no. LMW 2123), Opocrin, Corlo, Italy; RD heparin (lot no. 11885), Hepar Industries, Franklin, OH; Logiparin, LHN-1 (lot no. F 85030), Novo Industries, Copenhagen, Denmark; Enoxaparin, PK 10169 (lot no. 781), Pharmuka Laboratories, Gennevilliers, France, and the first international-LMW heparin standard 85/800 (1000 IU) freeze-dried in an ampule, NIBSC, London, England. Porcine mucosal heparin, sodium salt (160 units/mg, lot no. PM18885) was from Hepar Industries. Bovine lung heparin, sodium salt (a) (149 units/mg, lot no. 16F0188) and (b) (140 units/mg, lot no. 0324B) were from Sigma Chemical Co. and Upjohn Co., Kalamazoo, MI, respectively. Standard USP (Bethesda, MD) K1 heparin (365 units/mL) was used. Homogeneous, structurally defined heparin-oligosaccharide standards were prepared from porcine mucosal heparin¹⁸ and bovine lung heparin.²⁸ Antithrombin III and heparin cofactor II were either prepared from human plasma and purified to homogeneity by our laboratory²⁶ or purchased from KabiVitrum and Diagnostica Stago, Asnières, France, respectively. Factor IIa (thrombin) was from Ortho Diagnostics, Raritan, NJ, factor Xa was from Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, and chromogenic substrates were from American Diagnostics, Greenwich, CT. Heparin lyase (heparinase, EC 4.2.2.7) was prepared from *Flavobacterium heparinum*²⁴ and purified (5 units (μmol/min)/mg) to catalytic purity.²⁶ All reagents used in electrophoresis were from Fisher Chemical Co., Fairlawn, NJ. Carbazole was from Sigma Chemical Co.

Electrophoresis was performed on a Hoefer (San Francisco, CA) SE600 vertical-slab-gel unit equipped with a Bio-Rad (Richmond, CA) Model 1420B power source. Desalting was performed with Spectropore dialysis tubing (M, cut-off 1000) from Spectrum Medical, Los Angeles, CA, or with a P-2 gel desalting column from Bio-Rad. Gel permeation HPLC was performed with a TSK 3000

(22) Huckerby, T. N.; Sanderson, P. N.; Nieduszynski, I. A. *Carbohydr. Res.* 1986, 154, 16.

(23) Loganathan, D.; Wang, H. M.; Mallis, L. M.; Linhardt, R. J. *Biochemistry* 1990, in press.

(24) Galliher, P. M.; Cooney, C. L.; Langer, R.; Linhardt, R. J. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41, 360.

(25) Kim, Y. S.; Lee, K. B.; Linhardt, R. J. *Thromb. Res.* 1983, 61, 97.

(26) Yang, V. C.; Linhardt, R. J.; Berstein, H.; Cooney, C. L.; Langer, R. J. *Biol. Chem.* 1985, 260, 1849.

column (30 × 0.75 cm) on a Waters 840 liquid chromatography system equipped with a model 490 multiwavelength UV detector and a Digital 800 series minicomputer running Waters 840 software specifically designed for applications in the molecular weight determination of polymers. Strong anion exchange HPLC was performed with a Phase Separations (Norwalk, CT) Spherisorb (analytical column, 4.6 mm × 25 cm and semipreparative column, 2 cm × 26 cm, both were 5 µm particle size) column on dual LDC (Riviera Beach, CA) Constametric II pumps and a variable-wavelength UV-5 detector from ISCO, Lincoln, NE. Gradient control and data collection used an Apple IIe microcomputer running software from Interactive Microware, State College, PA. Conductivity was measured with a solution analyzer 4630A from Amber Scientific, San Diego, CA. Residual ash analysis was performed by Desert Analytics, Tucson, AZ.

NMR spectroscopy was performed in ²H₂O (99.996 atom %) with TSP-D₄ (99+ atom %) as internal standard both from Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, on a Bruker AM600 (1H at 600 MHz) spectrometer. The two-dimensional COSY-45 experiment²⁷ was run in the absolute magnitude mode with standard Bruker software on a Bruker WM 360 spectrometer equipped with ASPECT 2000 computer. A spectral width of 1404 Hz in both dimensions was used to collect a 512 × 2048 data matrix with 16 transients for each of the 512 experiments. The matrix was transformed by using sine-bell window functions in both dimensions. The sample concentration was about 5 mM. Mass spectrometry was performed on a VG Analytical ZAB-HP spectrometer operating under FAB mode.²⁸

Preparation of Low Molecular Weight Heparin Samples. Stock solutions of LMW heparins were prepared by dissolving bulk drug at 20 mg/mL in distilled water. Porcine and bovine heparins were dialyzed exhaustively against 100 volumes of distilled water, freeze-dried, and prepared at 20 mg/mL.

Analysis of Intact LMW Heparins. Stock solution of each LMW heparin (150 µL) was transferred to a sample container, freeze-dried, and analyzed for residual ash. A heparin sample (and a salt-free sample of hexasulfated tetrasaccharide) was similarly treated and was analyzed for ash content. A determination of the uronic acid content of each stock solution was made with carbazole.²⁹ Each stock solution (100 µL) was diluted 100-fold with distilled water, and the conductivity was determined at 25 °C.

Molecular Weight Profiling of LMW Heparins. Prior to their use, each gel permeation column was calibrated with a collection of anionic polymers serving as molecular weight standards.¹⁶ LMW heparin (20 µL, 10 mg/mL) was injected on the column and eluted with 0.5 M sodium sulfate at a flow rate of 1 mL/min and eluant was monitored at 205 nm. Values for retention time (*t_R*) and polymer dispersity (*D*) were determined and used along with the known molecular weights of the standards to calculate a calibration curve by the third polynomial regression with coefficients *D₀*, *D₁*, *D₂*, and *D₃*. Molecular weight was calculated with the use of eq 1. The total area under the elution

$$MW = D_0 + D_1(t_R) + D_2(t_R)^2 + D_3(t_R)^3 \quad (1)$$

curve was determined by integration. The computer also cut the curve into 50 equal time slices resulting in 50 MW and *t_R* values which could be used to determine *D*. The molecular weights were verified by viscometry.¹⁶ The molecular weight and dispersity of intact LMW heparin samples were also examined with gradient polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).¹³ LMW heparin (140 µL, 40 mg/mL) was analyzed on a gradient gel (12–22% linear gradient of total acrylamide) stained with alcian blue.¹³ Average molecular weight was estimated from an oligosaccharide ladder of bands (degree of polymerization (dp) = 2–30) of partially (80% completion) depolymerized bovine heparin.¹³

Activity of LMW Heparins. The antithrombin III mediated antifactor Xa activities of LMW heparins were measured against a standard curve constructed with use of the NIBSC standard

as previously reported.¹¹ The heparin cofactor II mediated antifactor IIa activities of the LMW heparin samples were determined with use of an amidolytic assay. Heparin or LMW heparin (0, 3, 6, and 9 µL of 1 mg of heparin/mL of distilled water) was added to 50 mM Tris-hydrochloride, 7.5 mM EDTA, and 150 mM sodium chloride, pH 8.4 buffer (340, 337, 334, and 331 µL, respectively). Heparin cofactor II (10 µL, 500 µg/mL in saline) and factor IIa (50 µL, 8.67 NIH units) were then added to each tube. Following incubation for 1 min at 37 °C, 200 µL of chromogenic substrate (0.75 mM Chromozym Th or Spectrozyme Th in distilled water) was added. The change in optical density at 405 nm was monitored for 1 min. Heparin (in micrograms) vs log *A*₄₀₅ was plotted. The IC₅₀ for each heparin sample was determined from its own standard curve by eq 2.

$$0.5 = \frac{[\Delta A_{405} \text{ with } 0 \mu\text{g/mL heparin} - \Delta A_{405} \text{ with } (IC_{50}) \mu\text{g/mL heparin}]}{[\Delta A_{405} \text{ with } 0 \mu\text{g/mL heparin} - \Delta A_{405} \text{ without factor IIa}]} \quad (2)$$

Oligosaccharide Mapping of LMW Heparins. LMW heparin (50 µL of 20 mg/mL) was added to 425 µL of 0.2 M sodium chloride and 5 mM sodium phosphate, pH 7.0. Heparin lyase (25 µL, 0.015 IU) was added to make the total solution volume 500 µL. The reactions were run at 30 °C to completion in 8 h and terminated by heating to 100 °C for 1 min. Depolymerized LMW heparin was analyzed by strong anion exchange HPLC by injecting two concentrations, 40 µg/40 µL and 4 µg/mL, onto the Spherisorb column equilibrated with 200 mM sodium chloride at pH 3.5. The sample was eluted with use of a linear salt gradient from 0.2 M to 1.4 M over 80 min at a flow rate of 1.5 mL/min. The elution profile was monitored at 282 nm, 0.02 AUFS. Peaks were tentatively identified by either coelution with an authentic sample or retention time. Depolymerized LMW heparin was analyzed with use of gradient PAGE by adding sample (40 µL of 40 µg/mL) to a stacking gel of 5% (total acrylamide) with a 12–22% linear gradient resolving gel.¹³ After 400 V was applied for 18 h (running a bromophenol blue marker 20 cm into the resolving gel), the gel was fixed and stained in alcian blue and destained.¹³ The bands were tentatively identified by comigration with authentic standards.

Isolation and Characterization of Unusual, Modified Oligosaccharides Present in LMW Heparins Prepared with the Use of Nitrous Acid and Oxidative Depolymerizations. Twenty five milligrams of LMW heparin CY 222 and 100 mg of RD heparin were depolymerized as described above with use of 375 and 1500 mIU of heparin lyase, respectively. The resulting oligosaccharide products were desalted with use of a 2.5 × 45 cm P-2 column eluted with water at a flow rate of 2 mL/min. After freeze-drying, each sample was reconstituted in 100 mg/mL of water and applied to a semipreparative strong anion exchange HPLC column¹⁴ to obtain the oligosaccharides of interest. The recovered oligosaccharide (3 (1.3 mg), 6 (2.5 mg)) was desalted, freeze-dried, and reappplied to the same HPLC column. Following final desalting and freeze-drying, oligosaccharides 3 and 6 were analyzed to be >85% and >95% pure, respectively, by analytical strong anion exchange HPLC and gradient polyacrylamide gel electrophoresis. After each sample was thoroughly exchanged with ²H₂O, ¹H NMR was obtained on each sample at 800 MHz with TSP as an internal standard. The FAB mass spectrum of oligosaccharide 6 was obtained with use of a triethanolamine matrix.²⁸

Oligosaccharide 6 gave a molecular ion at *m/z* 1180 [*M* – Na]⁺ when analyzed by FAB-MS corresponding to C₂₄H₄₀O₂₆NS₆Na₆. ¹H NMR (D₂O) (sugar residues of this tetrasaccharide are designated as A–B–C–D): residue A, δ 5.51 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, H-1), 4.62 (m, 1 H, H-2), 4.32 (m, 1 H, H-3), 5.99 (dd, *J*_{4,5} = 4.8 Hz, *J*_{2,3} = 1.2 Hz, 1 H, H-4); residue B, 5.44 (d, *J*_{1,2} = 3.6 Hz, 1 H, H-1), 3.31 (dd, *J*_{2,3} = 3.6 Hz, *J*_{3,4} = 10.8 Hz, 1 H, H-2), 3.65 (m, 1 H, H-3); 3.80–4.40 (m, 4 H, H-4, H-5, H-6, and H'-6); residue C, 5.19 (d, *J*_{1,2} = 3.1 Hz), 4.30 (m, 1 H, H-2), 4.21 (m, 1 H, H-3), 4.16 (m, 1 H, H-4), 4.61 (m, 1 H, H-5); residue D, 3.77 (m, 1 H, H-1), 3.71 (m, 1 H, H'-1), 4.00 (m, 1 H, H-2), 4.13 (m, 1 H, H-3), 4.16 (m, 1 H, H-4), 4.10–4.30 (m, 3 H, H-5, H-6, and H'-6).

Acknowledgment. This research was supported by the National Institutes of Health Research Grant Nos. HL 29797 and GM 38060 (R.J.L.) and the research and de-

(27) Nagayama, K.; Kumar, A.; Wuthrich, K.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* 1980, 40, 321.

(28) Mallis, L. M.; Wang, H. M.; Loganathan, D.; Linhardt, R. J. *Anal. Chem.* 1989, 61, 1453.

(29) Bitter, T.; Muir, M. H. *Anal. Biochem.* 1962, 4, 230.

191

velopment funds from the departments of Pathology and Thoracic-Cardiovascular Surgery of Loyola University Medical Center (J.F.).

Registry No. 1, 122363-71-2; 2, 98797-50-3; 3, 126580-50-5; 4, 126580-51-6; 5, 126580-52-7; 6, 126580-53-8; 7, 119370-32-0; 8, 126613-94-3; 9, 126720-81-8; heparin, 9005-49-6; antithrombin,

9000-94-6; blood coagulation factor Xa, 9002-05-5; blood coagulation factor IIa, 9002-04-4.

Supplementary Material Available: The SAX-HPLC chromatogram and gradient PAGE analysis (both glossy photo and a scan) of oligosaccharide 8 demonstrating its purity (1 page). Ordering information is given on any current masthead page.

Synthesis and Structure-Activity Relationships of 5-Substituted 6,8-Difluoroquinolones, Including Sparfloxacin, a New Quinolone Antibacterial Agent with Improved Potency¹

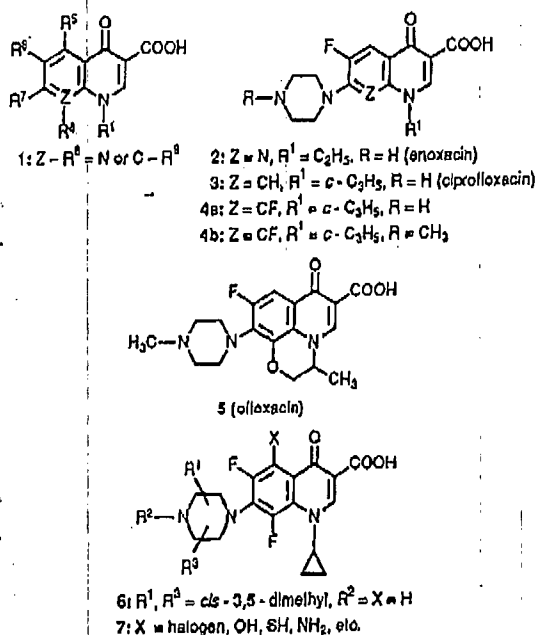
Teruyuki Miyamoto, Jun-ichi Matsumoto,* Katsumi Chiba, Hiroshi Egawa, Koh-ichiro Shibamori, Akira Minamida, Yoshiro Nishimura, Hidetsugu Okada, Masahiro Kataoka, Masahiro Fujita, Tohru Hirose, and Junji Nakano

Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Company, Ltd., Enoki 33-94, Suita, Osaka, 564, Japan.

Received September 20, 1989

A series of 5,7-disubstituted 1-cyclopropyl-6,8-difluoro-4(1H)-oxoquinoline-3-carboxylic acids (10-36) were prepared; the C-5 substituent in these compounds comprised halo, hydroxy, mercapto, and amino groups and the C-7 functional group included variously substituted piperazines. In vitro antibacterial screening results indicated that the amino group was optimal among the C-5 substituents. A combination of the C-5 amino group and the C-7 3,5-dimethylpiperazinyl appendage in this series conferred the best overall antibacterial property with lack of adverse drug interactions. Compound 36k [named sparfloxacin, originally AT-4140, 5-amino-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-7-(cis-3,5-dimethyl-1-piperazinyl)-4(1H)-oxoquinoline-3-carboxylic acid] was superior to ciprofloxacin in both in vitro and in vivo potency and hence was selected as a promising candidate for an improved therapeutic agent.

During recent years, much attention has increasingly been given to the synthesis of quinolone antibacterials as a source of new agents.² Successful chemical modifications³ in this area to date are realized especially at positions C-1 (ethyl, fluoroethyl, cyclopropyl, fluorophenyl, and methylamino), C-6 (fluoro), C-7 (4-pyridyl, piperazinyl, and aminopyrrolidinyl), C-8 (fluoro and chloro), and N-1-C-8 (-CH(CH₃)CH₂CH₂- and -CH(CH₃)CH₂O-) of the quinolones represented generically by 1. However, little attention has been paid to the role of C-5 substituents as a possible contributor to the antibacterial property of this class of agents; although several examples of C-5 variants, including alkyl,⁴ halo,^{4,5} nitro,^{6a} and amino⁶ groups, have



been reported, neither extensive structure-activity relationships (SARs) of the C-5 function nor clinically useful agents (or even promising candidates) appended with a C-5 substituent have been developed thus far. It seemed to us that the substitution at C-5 might influence activity, because the C-5 position neighbors on the C-4 oxo group,

- (1) This paper is Part 14 in the series Pyridonecarboxylic Acids as Antibacterial Agents. Part 13: Shibamori, K.; Egawa, H.; Nishimura, Y.; Miyamoto, T.; Matsumoto, J. *Chem. Pharm. Bull.*, accepted.
- (2) (a) Wentland, M. P.; Cornett, J. B. *Annu. Rep. Med. Chem.* 1985, 20, 145. (b) Cornett, J. B.; Wentland, M. P. *Ibid.* 1986, 21, 139. (c) Fernandes, P. B.; Chu, D. T. W. *Ibid.* 1987, 22, 117.
- (3) For reviews, see: (a) Albrecht, R. *Prog. Drug Res.* 1977, 21, 9. (b) Chu, D. T. W.; Fernandes, P. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, 33, 131. (c) Mitscher, L. A.; Zavod, R. M.; Sharma, P. N. *International Symposium on Quinolones*; Fernandes, P. B., Ed.; J. R. Prous Science (Barcelona, Spain) 1989; pp 3-20.
- (4) (a) Cecchetti, V.; Fravolini, A.; Fringuelli, R.; Mascellani, G.; Pagella, P.; Palmioli, M.; Segre, G.; Terni, P. *J. Med. Chem.* 1987, 30, 465. (b) Ueda, H.; Miyamoto, H.; Yamashita, H.; Tone, H. *Eur. Patent Appl.* EP 287951, 1988; *Chem. Abstr.* 1989, 110, 173109k.
- (5) (a) Fujiwara, T.; Fujimoto, M.; Yokota, T. *Japan Patent Kokai* 58-210092, 1983; *Chem. Abstr.* 1984, 100, 19187k. (b) Moran, D. B.; Ziegler, C. B., Jr.; Dunne, T. S.; Kuck, N. A.; Lin, Y.-i. *J. Med. Chem.* 1989, 32, 1313. (c) Domagala, J. M.; Mich, T. F.; Nicols, J. B. *US Patent* 4657913, 1987; *Chem. Abstr.* 1987, 106, 102107q. (d) Miyamoto, T.; Kataoka, M.; Nakano, J.; Matsumoto, J.; Nakamura, S. *Japan Patent Kokai* 64-9992, 1989.

- (6) (a) Frank, J.; Rakoczy, P. *Eur. J. Med. Chem.* 1979, 14, 61. (b) Hayakawa, I.; Tanaka, Y. *Japan Patent Kokai* 57-149286, 1982; *Chem. Abstr.* 1982, 98, 72117q. (c) Tanabe Seiyaku Co. *Japan Patent Kokai* 58-74367, 1983; *Chem. Abstr.* 1984, 100, 51467y.

192

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-003331- -00011-0000

Fecha: 2008-08-26 16:51:12 Dep. 2020 NUECLACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 41

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 62,244
FECHA : AGOSTO 4 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	434542	04/08/2008	40,844,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	103,000.00
		TOTAL :	\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010: 12457-841 -005-0

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

Radicación No. 03003331

Clasificación Internacional (IPC): C08B 37/10, A61K 31/727

Concepto Técnico No. 2885

Patente de Invención

☒

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Vía Nacional

☐

Vía PCT (fase nacional)

☒

Cap. I

☐

Cap. II

☒

No. Sol. Internacional

PCT/FR01/02332

Fecha de Presentación Internal.

18/07/2001

Como resultado del examen definitivo, realizado con fundamento en el artículo 48 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:

Folios: 34 a 51, 167 a 184

Reivindicaciones:

Folios 52 a 54 Como se radicó inicialmente
Folios 142 a 145 modificadas.

Rta. del Solicitante:

Folios: 152 a 191

Prioridad:

Fecha: 21/07/2000, País: FR y Número: 00/09572

1 Objeto de la invención

- Título de la solicitud: Mezclas de polisacáridos derivados de heparina, su preparación y las composiciones farmacéuticas que los contienen. Número de folio: 1 y 78.

Reivindicaciones 1 - 6: Mezclas de polisacáridos sulfatados que poseen la estructura general de los polisacáridos constitutivos de la heparina.

Reivindicaciones 7 - 18: Procedimiento de preparación de las mezclas que se caracteriza por:

Despolimerización de una sal de amonio cuaternario del éster bencílico de heparina (sal de benzetonio, cetilpiridinio o cetil trimetilamonio) en medio orgánico mediante una base orgánica fuerte (guanidina: 1, 5, 7-triazabicyclo[4.4.0] dec-5-eno y fosfacenos: 2-ter-butylimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafosforina y 2-ter-butylimino- tris (dimetilamino) fosforano) y de imidazolato de sodio

Reivindicación 19: Composiciones farmacéuticas.

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de compuestos útiles como agentes antitrombóticos. Especialmente útiles para la prevención de las trombosis venosas, los accidentes trombóticos arteriales, especialmente en el caso del infarto del miocardio. Generalmente útiles para la prevención y tratamiento de la proliferación de las células musculares lisas, la angiogénesis y como agentes neuroprotectores de la arteriosclerosis y la arteriosclerosis.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona mezclas nuevas de polisacáridos derivados de heparina.

Clasificación Internacional de Patentes (IPC.): C08B 37/10, A61K 31/727

2 De la solicitud de Patente (según el caso)

3.1 Descripción (artículo 28 D. 486)

- Realizadas las modificaciones a la descripción según los requerimientos realizados en el art. 45 es clara, y cumple con el requisito de claridad o divulgación completa en la descripción. Por lo tanto cumple con el requisito de claridad o comprensión de acuerdo al art. 28 de la Decisión 486.

3.2 Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

- Realizadas las modificaciones al capítulo reivindicatorio según los requerimientos establecidos en el art. 45 es claro y conciso y además está lo suficientemente sustentado por la descripción por lo tanto cumple con el requisito de definición claridad, concisión o sustento por la descripción de acuerdo al art. 30 de la Decisión 486.

4 Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria 21/07/2000

- Consultadas las bases de datos con que cuenta la oficina y las otras fuentes utilizadas para determinar el estado de la técnica no se encontró documento alguno relacionado con el objeto de la solicitud.

5. Respuesta a los argumentos del solicitante:

- Se aceptan como válidos los argumentos del solicitante en cuanto a la validez del nivel inventivo del compuesto reivindicado como resultado directo del proceso químico o enzimático utilizado para su despolimerización que al ser inventivo por sí mismo hace que sus propiedades fisicoquímicas y biológicas se vean alteradas alterando de esta forma las actividades anticoagulantes de las heparinas haciéndolas bio-inequivalentes.

6. Análisis de patentabilidad (según requisito) (artículo 14 D486)

Novedad (artículo 16 D486)

- No se encontró dentro del estado de la técnica, documento alguno que evidenciara la existencia de la invención.
- Por lo tanto es novedosa de acuerdo a lo estipulado en el art. 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Nivel inventivo (artículo 18 D486)

El problema técnico planteado en esta solicitud el cual es la necesidad de compuestos útiles como agentes antitrombóticos, para la prevención de las trombosis venosas, los accidentes trombóticos arteriales, el infarto del miocardio, la proliferación de las células musculares lisas, la angiogénesis y como agentes neuroprotectores de la arterosclerosis no se había resuelto previamente mediante el mismo tipo de compuestos ya conocidos. Por esta razón se considera que las mezclas de polisacáridos reivindicadas, su proceso de síntesis y composiciones que las contienen no son evidentes para una persona medianamente versada en la materia.

- No se encontró dentro del estado de la técnica, documento alguno que evidenciara la existencia de la invención.
- Por lo tanto tiene nivel inventivo de acuerdo a lo estipulado en el art. 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

6.1 Aplicación industrial (artículo 19 D 486)

- La invención tiene Aplicación Industrial.

7 Conclusión:

En consecuencia y por todo lo expuesto anteriormente, se recomienda **Conceder** las reivindicaciones: 1 a 19 (folios: 142 - 145).

Bogotá, D.C.,

CONCEPTO TECNICO No. 2885	EXAMINADOR TECNICO Código No. 202087
------------------------------	---

Handwritten signature