



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-95229

21 **EXPEDIENTE No**

54 **TÍTULO**

METODO PARA DETERMINAR CUANTITATIVAMENTE

LOS ESPECIFICOS QUE CONSTITUYEN HEPARINAS O LAS

HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR USANDO HPLC

51 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71 **SOLICITANTE**

AVENTIS PHARMA S A

DOMICILIO

ANTONY 92160, FRANCIA

74 **APODERADO**

EMILIO FERRERO

C C 438 019 de Usaquén

22 **BOGOTÁ, D C ,**

SS



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-095229- -00000-0000
Fee 2006-08-21 17:30 48 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTE/II
Eve. 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION
Folios. 68

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

24-10-06

SOLICITUD DE

1

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre **AVENTIS PHARMA S.A.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia

Dirección 20 Avenue Raymond Aron
Antony 92160
Francia

Domicilio Antony 92160
Francia

IDENTIFICACIÓN

CC ☐

NIT ☐

CE ☐

Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
APODERADO

Nombre **EMILIO FERRERO**
Dirección Carrera 4ª No 72-35
Teléfono 347 38 11
Fax 211 88 50
E-mail clientes@camyp.com
Domicilio Bogotá Colombia

IDENTIFICACIÓN

CC ☒

NIT ☐

CE ☐

Otro ☐

Cual

Número 438 019 T P 31 929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1 **Pierre MOURIER**
1 rue Etienne Méhul
Charenton Le Pont 94220
Francia

2 **Christian VISKOV**
3 rue du Béarn
Ris Orangis 91130
Francia

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No PCT/EP2005/003720

Fecha 22 de marzo de 2005

Publicación Internacional No WO 2005/090409 A1

Fecha 29 de septiembre de 2005

6

Título (54)

**MÉTODO PARA DETERMINAR CUANTITATIVAMENTE LOS
ESPECÍFICOS QUE CONSTITUYEN HEPARINAS O LAS
HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR USANDO HPLC**

7

Clasificación Internacional (51) C08B 37/00

A61K 31/727

A61P 7/02

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

04290790 7

(31) Número de Solicitud

24 de marzo de 2004

9

Comprobante de pago No 06-71.893

Fecha 18 de septiembre de 2006

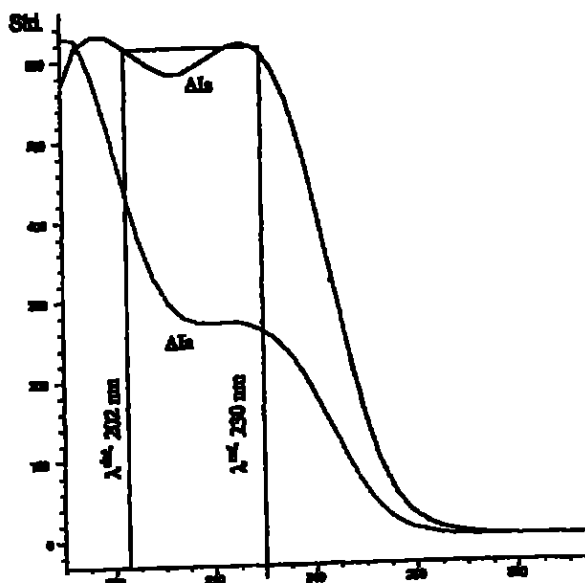
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463 000 oo
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ Otros VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA





12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE

EMILIO FERRERO

FIRMA


C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

DOCUMENTOS ANEXOS

- 1 ☒ Publicación Internacional WO 2005/090409 A1
- 2 ☒ **Forma PCT/ISA/210** Informe de Búsqueda Internacional
- 3 ☒ Extracto de publicación

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN
FASE INTERNACIONAL**

CAVELIER

ABOGADOS

EDIF. 1 SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, COLOMBIA

REPRESENTACION Y PODER

LE MINISTRE DES AFFAIRES ÉTRANGÈRES

Le Ministre que la présente certification de signature

et des officiales conformément à la loi française

Pour le Ministre et par délégation



AVENTIS PHARMA S.A.

résidant (s) à/domiciliado (s) en Antony, France

Pour brevets, modèles d'utilité, dessins industriels
marques de fabrique, de service, noms
commerciaux, enseignes, slogans

Para patentes, modelos de utilidad, diseños
industriales, marcas de fábrica, de servicio, nombres
comerciales, enseñas, lemas comerciales

REPRESENTATION ET POUVOIR

Le Ministre que la présente certification de signature

et des officiales conformément à la loi française

Pour le Ministre et par délégation

AVENTIS PHARMA S.A.

résidant (s) à/domiciliado (s) en Antony, France

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832, GONZALO PERDOMO, tpa. 831, EMILIO FERRERO, tpa. 31929 y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35 Bogotá Colombia en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio el primero como principal y los demás como suplentes en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero o el tercero al segundo. En tales casos el representante principal, o el primero o segundo suplente en su caso o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público o Cónsul de Colombia, en el extranjero y si se tratare de impedimento con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no, jurisdicción especialmente ante las del orden administrativo contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales el registro de marcas de fábrica, colectivas defensivas de servicio lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas y denominaciones de origen, su renovación, traspaso cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos, b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor oposición, cancelación administrativa y judicial, nulidad medidas cautelares, concesión de licencias la tutela, la protección de secretos industriales y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos, acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir conciliar admitir los hechos del proceso desistír cancelar recibir renunciar y ratificar los actos de agentes oficiales.

Je soussigne M. Hubert FOMMERY

Notaire à Paris

Cl. sic matériellement

le 10 octobre 2000

Monsieur Magali LE PENNEC

Apposée sur le présent document

CAVELIER ABOGADOS

WPPODERE-6 (MINUTA N° 1211326)

Signé le/Dado y firmado hoy 31 octobre 2000

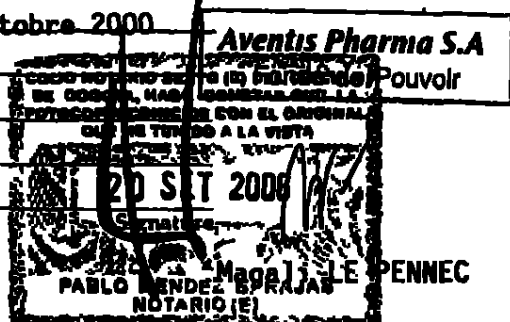
à/en Antony

AVENTIS PHARMA S.A.

Firma

par cet instrument désigne à GERMAN CAVELIER, tpa. 832, GONZALO PERDOMO tpa. 831 EMILIO FERRERO tpa. 31929 et LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 domiciliés à Bogotá, Colombie Carrera 4ª N° 72-35 conformément au paragraphe 1 de l'Article 543 du Code de Commerce le premier comme principal et les autres comme suppléants dans leur ordre, comme (mes) (nos) représentants dans toutes les affaires concernant la propriété industrielle ayant la faculté de recevoir les notifications et de nommer des mandataires judiciaires ou extrajudiciaires. Le premier représentant suppléant remplacera le principal en cas d'absence ou d'empêchement temporaire ou définitif de celui-ci. La même règle sera appliquée quand il faudra que le deuxième représentant suppléant remplace le premier ou le troisième au deuxième. Dans ces cas, le représentant principal ou le premier ou le deuxième suppléant dans leur cas, ou les deux, déclareront leur intention de ne pas exercer la représentation moyennant déclaration par devant Notaire Public en Colombie, ou par devant Notaire ou tout autre Fonctionnaire Public ou Consul de la Colombie à l'étranger et s'il s'agissait d'empêchement, avec le certificat respectif. Si un des nommés venait à manquer définitivement le suivant prendra sa place. Quand l'absence ou l'empêchement du représentant principal, ou de son premier ou second suppléant dans leur cas, aura cessé, ils pourront exercer leur représentation dans leur ordre l'un ou les autres, suivant le cas, l'assumant par le seul fait de l'exercer cessant à ce moment là l'exercice de la représentation par le premier deuxième ou troisième suppléant dans leur cas.

Par ailleurs je (nous) octroi (octroyons) pouvoir aux avocats ci-avant mentionnés pour obtenir la protection de ma (notre) propriété industrielle et contre la concurrence déloyale, à cet effet, autorisons (ons) les dits fondés de pouvoir à me (nous) représenter devant toutes entités ou personnes, avec ou sans juridiction, particulièrement devant celles de l'ordre administratif contentieux-administratif et judiciaire ainsi que devant les Tribunaux d'Arbitrage pour tout ce qui concerne les affaires suivantes: a) l'obtention de brevets d'invention, modèles d'utilité dessins industriels, le dépôt de marques de fabrique collectives defensives de service, slogans, noms commerciaux enseignes et dénominations d'origine leur renouvellement transfert changement de nom ou domicile radiation volontaire et l'enregistrement des contrats de licence b) les actions de concurrence déloyale, protection du consommateur opposition, radiation administrative ou judiciaire annulation contrefaçon, licences, la tutelle protection des secrets industriels, et les procès civils, pénaux, administratifs ou contentieux-administratifs ayant trait à ces droits, actions et procès établis par moi (nous) ou contre moi (nous) et c) afin que pour toutes les questions mentionnées ci-dessus ils puissent substituer ce pouvoir transiger concilier admettre les faits du procès renoncer et ratifier les actes des agents officiels ou personnes sans mandat.



CONJUNTO 1

COGO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONFORME CON EL ORIGINAL
QUE HA TENIDO A LA VISTA
20 SET 2006
PABLO MENDEZ BARRIAS
NOTARIO (F)



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
PARIS FRANCIA

No 4576

París, Noviembre 30 de 2000

El suscrito Cónsul General de Colombia en París vistos los documentos presentados por los interesados,

CERTIFICA

Que el señor Richard REQUENA, quien constató que la autenticación de la firma del signatario del poder precedente fue efectuada de conformidad con la ley francesa, ejercía en la fecha las funciones de Adjunto Administrativo de la Administración Central de la Dirección de los Franceses en el Exterior y de los Extranjeros en Francia del Ministerio de Asuntos Exteriores de Francia, y que su firma corresponde con la registrada en este Consulado,

Que la compañía AVENTIS PHARMA S.A es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de la República Francesa y que cumple con su objeto conforme a las mismas,

Que la señora Magali LE PENNEC quien en su calidad de Apoderada de la compañía otorga el poder precedente está legal y expresamente facultada para hacerlo

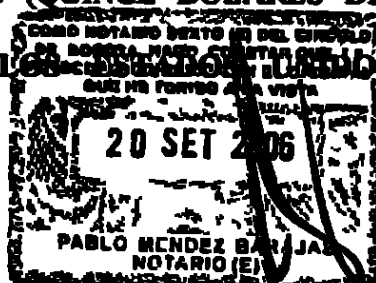
El Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento


Alejandro Borda Rojas
Cónsul General

Pagado Impuesto de Timbre por valor de US\$7,00 (SIETE DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA)

Pagados Derechos Consulares por valor de US\$15 (QUINCE DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA)

Total US\$22 (VEINTIDOS DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA)

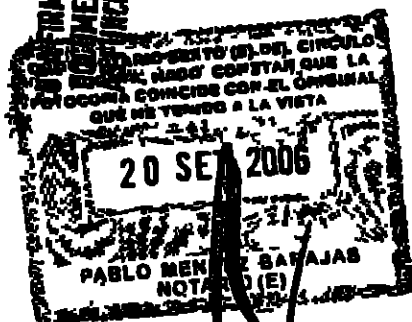


Inducción Oficial No.
JEAN JACQUES H. TURPIN
Inductor e Integrante Oficial
FRANCIS ESPAROL
Res. Municipal No. 2480/91

264/00

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2000 DEC 12 A 10-21
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
6085533
FIRMA A PARCE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
INDICACIONES INDICADAS



7

TRADUCCIÓN OFICIAL No 264/00 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCÉS EL CUAL PARA SU IDENTIFICACIÓN SE SELLA CON EL SELLO DEL TRADUCTOR ESTA ES UNA TRADUCCIÓN OFICIAL EFECTUADA EL DIA 14 DE DICIEMBRE DEL AÑO 2000 POR JEAN-JACQUES TURPIN C E 193849 DE BOGOTÁ, TRADUCTOR OFICIAL SEGUN RESOLUCIÓN No 2680/91 DEL 19 DE DICIEMBRE DE 1991 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA.

Autenticaciones que se hallan a continuación de un documento de representación y poder confendo en francés y en español por AVENTIS PHARMA S.A. domiciliada en Antony Francia y otorgado a los Doctores Germán Cavelier TPA 832 Gonzalo Perdomo TPA 831 Emilio Ferrero TPA 31929 y Luz Clemencia de Paez TPA 23555 todos domiciliados en Bogotá Colombia Carrera 4 No 72-35

Dado en Antony el 31 de octubre del 2000 Firma ilegible de Magali LE PENNEC

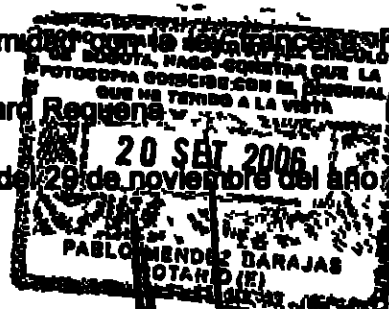
Sello AVENTIS PHARMA S.A. Apoderada

Legalización de la firma Magali LE PENNEC por el Señor Hervé Pommery Notario en Paris Firma del Notario

Sello seco Hervé Pommery – Notario asociado en Paris – Corte de apelación – República Francesa

Sello en tinta del Ministerio de Relaciones Exteriores Hace constar que la presente certificación de firma se ha efectuado de conformidad con la ley francesa. Por el Ministro y por delegación Firmado (ilegible) Richard Requeña

Otro sello del Ministerio de Relaciones Exteriores del 29 de noviembre del año 2000 bajo el No 018302 - República Francesa 010



**Intérprete Oficial No. 264/00
JEAN JACQUES H. TURPIN
Traductor e Intérprete Oficial
FRANCOES ESPANOL
Res. Ministerial No. 2680/91**

A

ANEXO EN ESPAÑOL

Certificación, por parte del Consulado General de Colombia en Paris Francia No 4576 del 30 de noviembre del año 2000 de la firma de Richard Requena quien desempeña las funciones de Adjunto Administrativo de la Administración Central de la Dirección de los Franceses en el Exterior y de los Extranjeros en Francia del Ministerio de Asuntos Exteriores de Francia Además certifica la existencia y representación de la compañía **AVENTIS PHARMA S.A.** y certifica que la Señora **Magali LE PENNEC** desempeña el cargo de Apoderada de dicha compañía y está facultada legal y expresamente para conferir el presente poder Sello del Consulado General de Colombia en Paris Pagado el impuesto de timbre por valor de veintidós dólares (US\$22 oo) Sello y firma del Cónsul General Alejandro Borda Rojas

Legalización de la firma de Alejandro Borda Rojas por el Ministerio de Relaciones Exteriores en Bogotá No 608553 del 12 de diciembre del año 2000 Firma y sello del Jefe de legalizaciones

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para confrontación y a la cual me remito

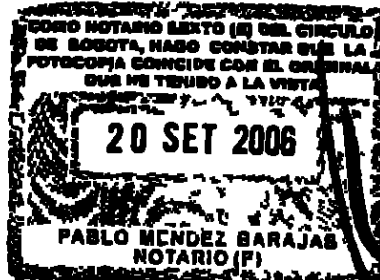
Traducción oficial No 264/00

Colo 12457-801-001-7

Traductor Jean-Jacques Turpin

Santafé de Bogotá D C 14 de diciembre del año 2000

Traducción Oficial No. **264/00**
JEAN JACQUES H. TURPIN
Traductor e Intérprete Oficial
FRANCE ESPANOL
Res. Ministerio No. 2480/91



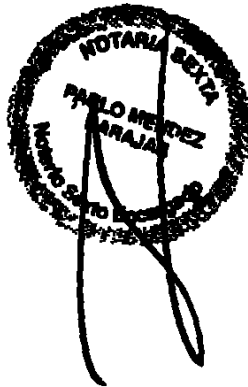
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

Jean Jacques H. Turpin

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTA FE DE BOGOTA 15 DIC. 2000



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL NOTARIO

2000 DIC 18

DE LEGALIZACIONES
SANTA FE DE BOGOTA D.C.

NOTARIO SEXTO (N) DEL CIRCULO
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

20 SET 2006

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (N)

HE FIRMADO DEL AGENDE

EXTERIORES

495453

COYA FIRMA PARECE EN
DOCUMENTO DE SANTA FE
LAS FUENTES

9

CAVELIER
ABOGADOS

WEB SITE www.cavellerabogados.com
E MAIL caveller@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No 72 35
BOGOTA 8 COLOMBIA

TELEFONO (57) (1) 347 3611
TELEFAX (57) (1) 217 9211 (57) (1) 310 4995

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

Poderdante AVENTIS PHARMA S A

Poder conferido el 31-10-2000

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No 31 929, con todas las facultades que me fueron conferidas

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento

Señor Jefe

GERMAN CAVELIER

T P A No 832

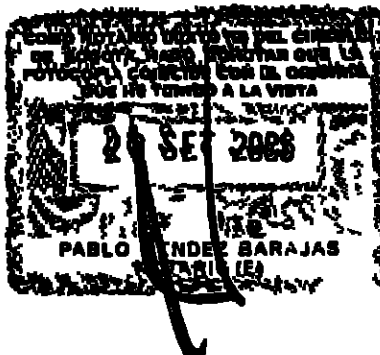
C C No 2 877 924 de Bogotá

Acepto

EMILIO FERRERO

T P A N° 31 929

C C No 438 019 de Usaquén



2e-780-2

NIT 860 041 367 3

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACIÓN PERSONAL

Sede de Bogotá D.C. 09 NOV 2006

Así: Mr. JUAN MANUEL BOTERO M. DINA

Nº CIRULO SEXTO DEL CIRULO DE BOGOTÁ

Compareció(eron) personalmente German
Cavelier y Danilo
Ferrero

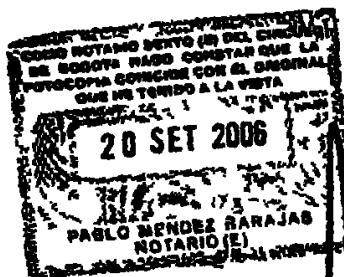
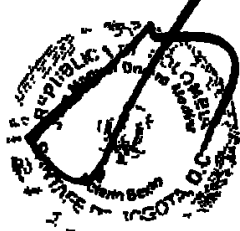
quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C. # 2.877.924 Bta
CC # 438.019. USA 9

y la(s) Libre(s) Militar(es) TP # 832
TP # 31.929

Identificado(s) en Bogotá y declaró(aron) que la(s) firma(s) que
aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que
el contenido del mismo es cierto
" constancia se firma esta diligencia

German Cavelier

German Ferrero



(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 September 2005 (29.09.2005)

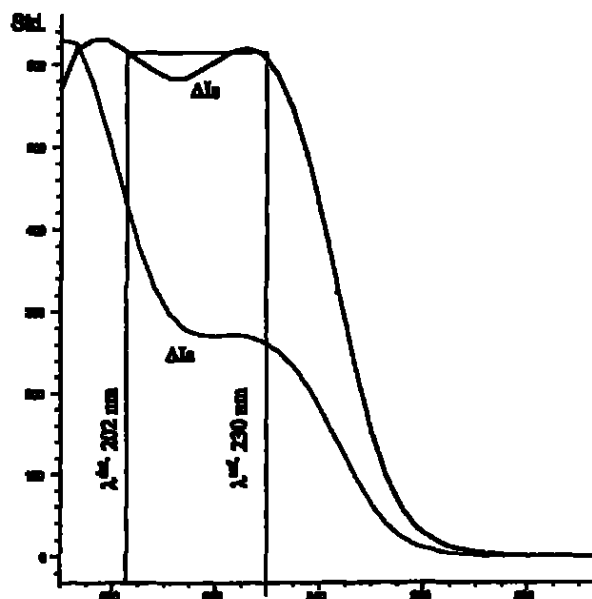
PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/090409 A1

- (51) International Patent Classification⁷ C08B 37/00 (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available) AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GR, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (21) International Application Number⁷ PCT/EP2005/003720
- (22) International Filing Date 22 March 2005 (22.03.2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data. 04290790.7 24 March 2004 (24.03.2004) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR] 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 ANTONY (FR).
- (72) Inventors, and (75) Inventors/Applicants (for US only) MOURIER, Pierre [FR/FR] 1 rue Etienne Mèhul, F-94220 CHARENTON LE PONT (FR). VISKOV, Christian [FR/FR] 3 rue du Béarn, F-91130 RIS ORANGIS (FR).
- (74) Agent: ROUSSEAU, Patrick; AVENTIS PHARMA S.A., Patent Department, 20 Avenue Raymond Aron, F-92165 ANTONY CEDEX (FR).
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).
- Published.
— with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY DETERMINING SPECIFIC CONSTITUTING HEPARINS OR LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARINS USING HPLC



(57) Abstract: A method for analyzing heparins or low-molecular-weight heparins, characterized in that the sample to be assayed is depolymerized by the action of heparinases and then, where appropriate, the depolymerizate obtained is reduced and then an analysis is carried out by high performance liquid chromatography.

11

METHOD FOR QUANTITATIVELY DETERMINING SPECIFIC CONSTITUTING HEPARINS OR LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARINS USING HPLC

An embodiment of the present invention is a method for detecting or quantifying the amount of components having a 1-6 anhydro structure or
5 acetylated sugars in a sample of fractionated heparins or unfractionated heparins

Heparins are biologically active agents of the glycosaminoglycan family extracted from natural sources, and have valuable anticoagulant and antithrombotic properties. In particular, they are useful in the treatment of
10 postoperative venous thromboses

To create low molecular weight heparins (LMWH) from source heparin, the longer heparinic polysaccharide chains must be broken down into shorter chains of lower molecular weight. This can be done by either chemical or enzymatic depolymerization. The result can be average molecular weights for
15 LMWH polysaccharide chains of approximately 5,000 Da. LMWHs, like unfractionated heparin, inhibit coagulation by binding to ATIII at particular pentasaccharide sequences distributed along some of the polysaccharide chains.

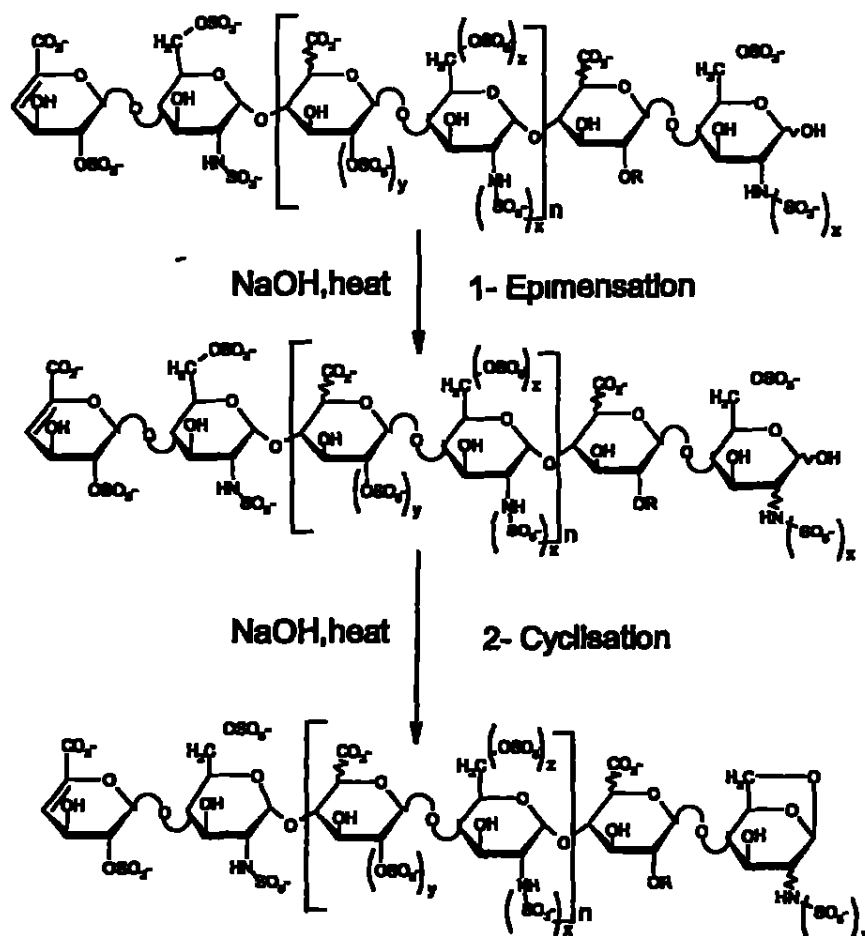
Each LMWH manufacturer of an approved product utilizes a distinct depolymerization process. Unless two manufacturers use the same process, this process distinction results in LMWHs with distinct chemical structures and, therefore, differing pharmacological activity and different approved indications for clinical use. The resulting LMWHs are structurally differentiated by the depolymerization processes used for their manufacture (R.J. Linhardt
25 et al., *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1999, 25(3 Supp.) 5-16). As a result, LMWHs are more heterogeneous than heparin. Each different process causes unique and highly complex structural modifications to the polysaccharide chains. These modifications include differences in chain lengths and chain sequences, as well as in structural fingerprints.
30 Consequently, the different LMWHs may have distinctive pharmacological profiles and different approved clinical indications.

— — —

Enoxaparin sodium is available from Aventis and sold in the United States in the form of enoxaparin sodium injection under the trademark Lovenox® (Clexane® in some other countries) In general, enoxaparin sodium is obtained by alkaline degradation of heparin benzyl ester derived from porcine
5 intestinal mucosa Its structure is characterized, for example, by a 2-O-sulfo-4-enepyranosuronic acid group at the non-reducing end and a 2-N,6-O-disulfo-D-glucosamine at the reducing end of the chain The average molecular weight is about 4500 daltons The molecular weight distribution is

	<2000 daltons	≤20%
10	2000 to 8000 daltons	≥68%
	>8000 daltons	≤18%

In the manufacture of enoxaparin sodium, there is a 6-O-desulfation of the glucosamine, leading to the formation of derivatives called "1,6 anhydro" (International Patent Application WO 01/29055), as shown below



This type of derivative is only obtained for oligosaccharide chains whose terminal glucosamine is 6-O-sulfated

The percentage of oligosaccharide chains whose end is modified with a 1,6-anhydro bond is a structural characteristic of the oligosaccharide mixture of enoxaparin sodium and it should be possible to measure it. Based on current knowledge, between 15 % and 25 % of the components of enoxaparin sodium have a 1,6-anhydro structure at the reducing end of their chain

An embodiment of the present invention therefore provides a method for analysing unfractionated heparins and fractionated heparins "Fractionated heparins" as used herein refers to any heparin that undergoes depolymerization, for example low-molecular-weight heparins (LMWH), including enoxaparin sodium and any LMWH seeking approval by a

regulatory authority pursuant to an application citing Lovenox®/ Clexane® (enoxaparin sodium injection) as the listed drug

In one embodiment, the method of analysis according to the invention is the following

- 5 The sample to be assayed is depolymerized by the action of heparinases and then where appropriate the depolymerizate obtained is reduced and then analysis is carried out by high-performance liquid chromatography

The method as defined above is therefore characterized in that the depolymerizate is analysed to detect the presence of oligosaccharide chains
10 whose end is modified with a 1,6-anhydro bond ("1,6-anhydro groups")

In a related embodiment, the sample to be assayed is first exhaustively depolymerized with a mixture of heparinases, for example heparinase 1 (EC 4.2.2.7), heparinase 2 (heparin lyase II) and heparinase 3 (EC 4.2.2.8), for example with each heparinase being present as 0.5 units/ml (These
15 enzymes are marketed by the group Gramplan Enzymes)

A subject of the invention is therefore a method for analysing unfractionated heparins or fractionated heparins comprising the following steps

- (a) depolymerization of the sample by the action of heparinases
(b) where appropriate reduction of the depolymerizate
20 (c) analysing the sample of step (a) or (b) by high-performance liquid chromatography

In one embodiment, the subject of the invention is the method as defined above wherein the heparinases are in the form of a mixture of heparinase 1 (EC 4.2.2.7), heparinase 2 (heparin lyase II), and heparinase 3 (EC 4.2.2.8)

- 25 The depolymerizate thus prepared may then be treated to reduce the reducing ends that are not in the 1,6-anhydro form (products described in patent application WO 01/72762) In one embodiment, the depolymerizate may be treated with an NaBH₄ solution in sodium acetate to reduce the reducing ends that are not in the 1,6-anhydro form Finally in order to be able
30 to quantify the disaccharides 1 and 2 described below, the sample of low-

molecular-weight heparin depolymerized with heparinases, may be reduced by the action of a reducing agent such as NaBH_4 .

A subject of the invention is therefore the method as defined above, wherein the depolymerized heparin is then reduced

- 5 A subject of the invention is additionally the method as defined above, wherein the reducing agent is NaBH_4 . Other alkali metal salts of borohydride such as lithium or potassium may also be used

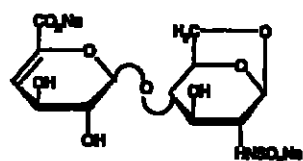
The methods of assay according to the invention make it possible to clearly differentiate enoxaparin sodium from other low-molecular-weight heparins

- 10 which do not contain "1,6-anhydro" derivatives. Conversely, the methods of the invention make it possible to ascertain that low-molecular-weight heparins do not have the physicochemical characteristics of enoxaparin sodium and therefore are different in nature

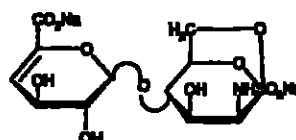
- 15 The methods according to the invention may, for example be applied to the industrial process during in-process control of samples in order to provide standardization of the process for manufacturing enoxaparin sodium and to obtain uniform batches.

- 20 After enzymatic depolymerization and optional reduction of the reducing ends the 1,6-anhydro derivatives of enoxaparin sodium exist in 4 essential forms, namely disaccharide 1, disaccharide 2, disaccharide 3 and tetrasaccharide 1

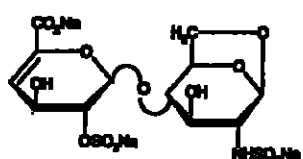
A subject of the invention is therefore also the method as described above, wherein the 1,6-anhydro residues obtained during the depolymerization reaction include the following



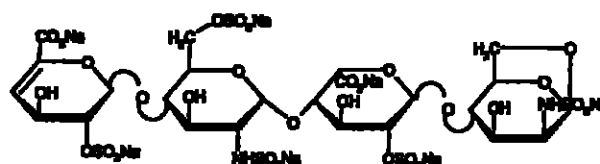
disaccharide 1



disaccharide 2



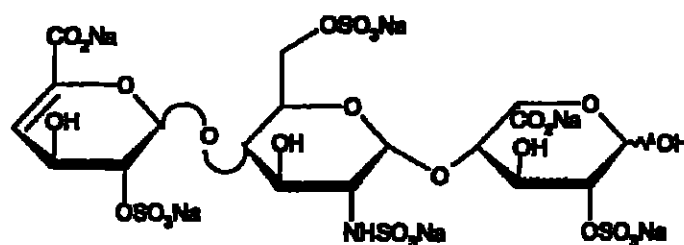
disaccharide 3



tetrasaccharide 1

All the oligosaccharides or polysaccharides that contain the 1,6-anhydro end on the terminal disaccharide unit and that do not possess a 2-O-sulfate on the uronic acid of said terminal disaccharide are completely depolymerized by the hepannases and are in the form of the disaccharides 1 and 2. On the other hand, when the terminal saccharide contains a 2-O-sulfate on the uronic acid and when it is in the mannosamine form, the 1,6-anhydro derivative is in the form of tetrasaccharide 1 (form resistant to hepannases)

Trisaccharide 1 (see below) may also be present in the mixture. It is derived from another degradation process that leads to the structure below (peeling phenomenon observed during the chemical depolymerization of enoxaparin sodium)

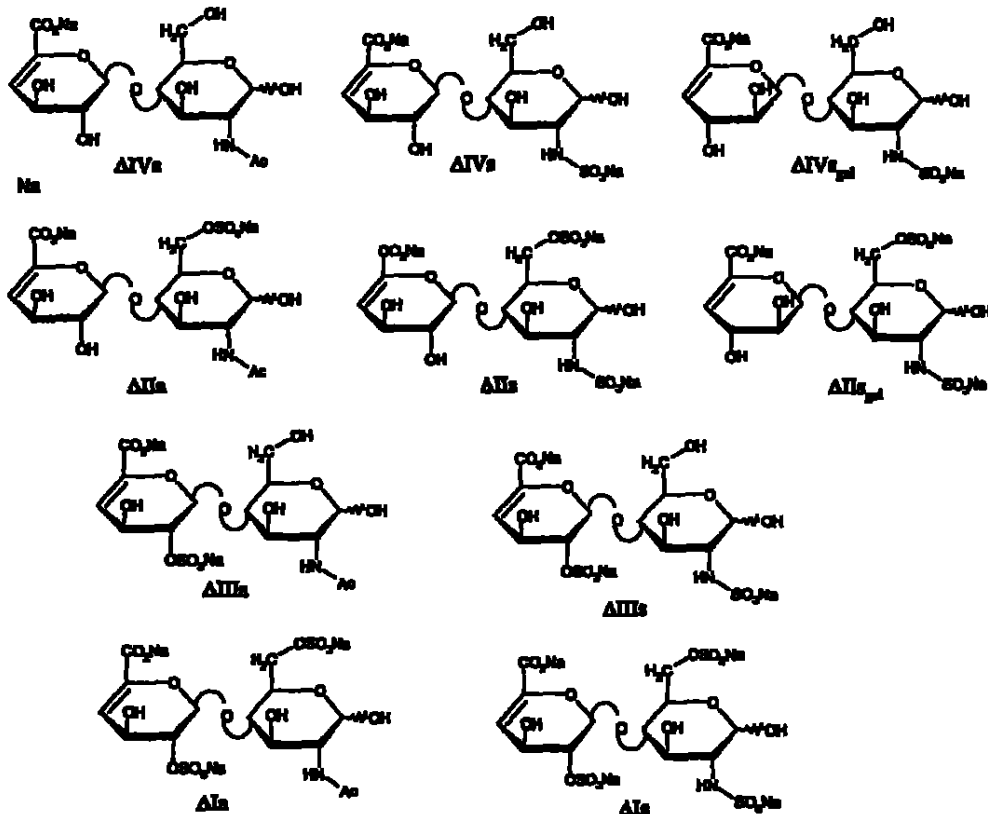


trisaccharide 1

The other constituents of the mixture are not characteristic solely of enoxaparin sodium. There are of course the 8 elementary disaccharides of the heparin chain. These 8 elementary disaccharides are marketed inter alia by the company Sigma.

Other disaccharides were identified in the mixture by the method according to the invention the disaccharides ΔIIS_{gal} and ΔIVS_{gal} which have as their origin alkaline 2-O-desulfation of $-IdoA(2S)-GlcNS(6S)-$ and of $-IdoA(2S)-GlcNS-$, leading to the formation of 2 galacturonic acids They are not usually present

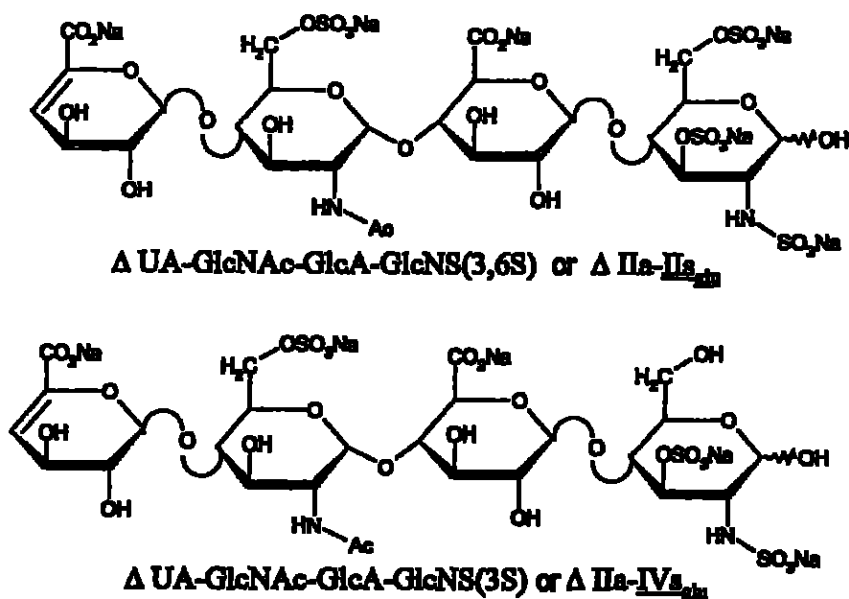
5 In the original structure of heparin (U M Desai et al, Arch Biochem Biophys, 306 (2) 461-468 (1993))



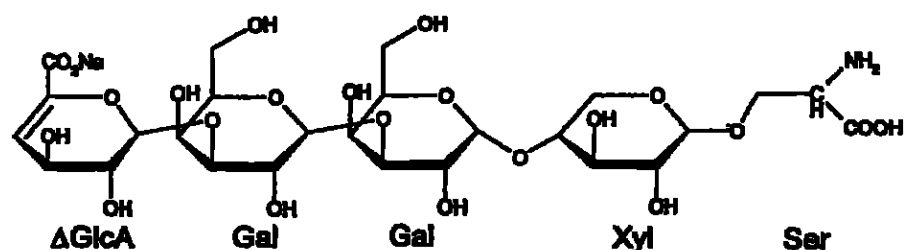
Oligosaccharides containing 3-O-sulfated glucosamines withstand cleavage by heparinases and remain present in the form of tetrasaccharides

10 In the case of most low-molecular-weight heparins the heparin is extracted from pig mucosa, and these principal tetrasaccharides are represented below These tetrasaccharides are resistant to enzymatic depolymerization and reflect the sequences with affinity for antithrombin III These tetrasaccharides are symbolized as follows $\Delta Ia-IIa_{glu}$ and $\Delta Ia-IVa_{glu}$ (S YAMADA K.

YOSHIDA, M SUGIURA, K-H KHOO H R. MORRIS A. DELL, J Biol
Chem 270(7), 4780-4787 (1993))



The final constituent of the mixture cleaved with heparinases is the
5 glycosenne end Δ GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser (K. Sugahara, et al J Biol Chem
270(39) 22914-22923 (1995), K. Sugahara et al J Biol Chem 267(3),
1528-1533 (1992)) The latter is generally almost absent from enoxaparin
sodium (see NMR in Example 5)



10 In another aspect, the invention provides a chromatography process for
detecting 1,6-anhydro groups In one embodiment, the method involves
separating the various oligosaccharides obtained after depolymerization and
optionally treatment with a reducing agent such as NaBH₄
The separation of the various oligosaccharides according to the present
15 invention may be carried out by HPLC (High Performance Liquid

15

Chromatography) In one embodiment, the HPLC is anion-exchange chromatography In a related embodiment, the anion-exchange chromatography is strong anion exchange chromatography (SAX)

As used herein, the term "strong anion exchange chromatography" (SAX) encompasses anion exchange chromatography conducted on any resin that maintains a constant net positive charge in the range of about pH 2-12 In certain embodiments of the invention strong anion exchange chromatography uses a solid support functionalized with quaternary ammonium exchange groups For example, columns such as Spherisorb® SAX (Waters Corp Milford MA) may be used having particle size of about 5 µm a column length of about 25 cm and a column diameter of between about 1 mm and about 4.6 mm may be used

The equipment used may be any chromatograph that allows the formation of an elution gradient and that is equipped with a suitable UV detector that is suitable for selective detection of acetylated sugars In one embodiment of the invention, the UV detector is an array of diodes that permits the generation of UV spectra of the constituents and allows complex signals resulting from the difference between the absorbance at 2 different wavelengths to be recorded Such a diode array detector allows the specific detection of acetylated oligosaccharides In a related embodiment, HPLC mobile phases that are transparent in the UV region up to 200 nm are used In this embodiment, conventional mobile phases based on NaCl which have the additional disadvantage of requiring a passivated chromatograph in order to withstand the corrosive power of the chlorides, are excluded Mobile phases that can be used according to this embodiment of the invention include, but are not limited to mobile phases based on sodium perchlorate methanesulfonate or phosphate salts In one embodiment, the mobile phase is an aqueous solution of ammonium methane sulfonate

A subject of the invention is therefore also a method of analysis as defined above by separation by anion-exchange chromatography, wherein a mobile

phase that is transparent in the UV region from about 200 nm to about 400nm is used

In certain embodiments the strong anion chromatography separation is performed at a pH from about 2.0 to about 6.5. In a related embodiment, a pH in the region of about 3 will be used. The pH may be controlled for example, by adding a salt to the mobile phase which possesses a buffering power at pH = 3. In certain embodiments of the invention, a salt such as a phosphate salt, which has greater buffering capacity at pH 3 than that of perchlorates is used. Exemplary chromatographic separation conditions are given below.

Mobile Phase

Solvent A. NaH_2PO_4 2.5 mM, brought to pH 2.9 by adding H_3PO_4

Solvent B NaClO_4 in 1N NaH_2PO_4 2.5 mM, brought to pH 3.0 by adding H_3PO_4

The elution gradient may be the following

T = 0 min %B = 3, T = 40 min %B = 60, T = 60 min %B = 80

A suitable temperature, e.g. from about 40°C to about 50°C, and pump flow rate is chosen according to the column used.

Other methods of purifying samples by SAX chromatography are known to those skilled in the art. For example, SAX methods are described by K. G. Rice and R. J. Linhardt, Carbohydrate Research 190, 219-233 (1989), A. Lamkjaer, et al. Carbohydrate Research 266 37-52 (1995), and in patent WO 90/01501 (Example 2). The contents of these references are incorporated herein in their entirety.

Another aspect of the invention is a method of detecting specific groups found in unfractionated heparins or fractionated heparins.

In one embodiment, this method increases the specificity of the UV detection of heparin or LMWH groups. As nonacetylated polysaccharides all have, at a given pH, a fairly similar UV spectrum, it is possible to selectively detect the acetylated sugars by taking as signal the difference between the absorbance

at 2 wavelengths chosen such that the absorptivity of the nonacetylated saccharides is canceled out.

As illustrated below by way of example, 202 nm and 230 nm may be chosen as detection and reference wavelengths and the 202-230 nm signal may be recorded. A person skilled in the art would appreciate that the choice of wavelength that can be used according to the present invention will depend on the pH of the mobile phase (adjustments of a few nm may be necessary so as to be at the optimum of the pH).

Any UV detector that can simultaneously measure absorbance at two or more wavelengths may be used in the invention. In one embodiment of the invention, the DAD 1100 detector from the company Agilent Technologies is used. In this embodiment a double detection will be carried out at 234 nm, on the one hand, and at 202-230 nm, on the other hand. The principle of selective detection of acetylated oligosaccharides is illustrated in Figure 1 in which the UV spectrum of a sulfated disaccharide Δ Is is compared with that of an acetylated disaccharide Δ Ia.

A subject of the present invention is therefore also a method of analysis as defined above wherein the method of detection makes it possible to selectively detect acetylated sugars.

In certain embodiments, the method of analysis uses separation by SAX chromatography, and acetylated sugars are selectively detected by measuring the difference between the absorbance at two wavelengths chosen such that the absorptivity of the nonacetylated saccharides is cancelled out.

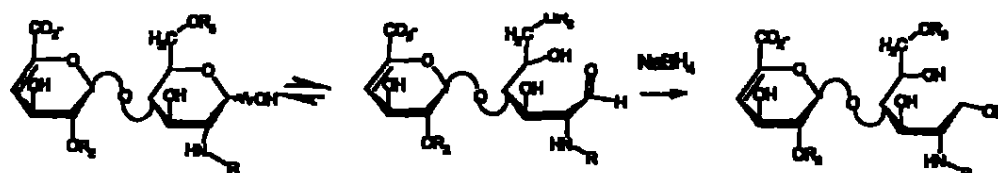
The quantification of the four 1,6-anhydro residues described above requires a sufficient selectivity of the chromatographic system in relation to all the other constituents of the mixture. However, the two disaccharides 1 and 2, which are co-eluted in general, are poorly resolved with respect to Δ Ia, especially as the latter is present in the form of its two α and β anomers.

The identity of the two disaccharides 1 and 2 may be easily verified because they form in a few hours at room temperature in an aqueous solution of Δ IIs.

brought to pH 13 by adding NaOH. However, if double detection is used the acetylated oligosaccharides ΔIVa , ΔIIa , $\Delta IIIa$, ΔIa , $\Delta IIa-IVs_{glu}$ and $\Delta IIa-IIIs_{glu}$ are easily identifiable.

The causes of splitting of the peaks are the anomeric forms, on the one hand, and to a lesser degree the glucosamine $\leftrightarrow$ mannosamine epimerization which is partially present for ΔIIs , $\Delta IIIs$ and ΔIs when they are in the terminal position in the oligosaccharide chain.

In certain embodiments of the invention the disaccharides 1 and 2 are quantified by reducing the sample of low-molecular-weight heparan previously depolymerized by heparinases via the action of $NaBH_4$.



α anomer + β anomer

This reduction has the advantage of eliminating the $\alpha \leftrightarrow \beta$ anomerisms by opening the terminal oligosaccharide ring. The chromatogram obtained is simpler since the anomerisms are eliminated. Moreover, the reduction of ΔIIa reduces its retention on the column and allows easy assay of the disaccharides 1 and 2.

The examples of chromatograms described in Figures 2 and 3 clearly illustrate these phenomena and the advantages of this method.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 illustrates the selective detection of acetylated oligosaccharides in which the UV spectrum of a sulfated disaccharide Δ is compared with that of an acetylated disaccharide Δ la, wherein the x-axis represents wavelength (nm) and the y-axis represents absorbance (mAmps)

Figure 2 shows the chromatographic separation of enoxaparin depolymerized with heparinases before and after reduction with NaBH_4 (signal in fine black UV at 234 nm, signal in thick black UV at 202-234 nm), wherein the x-axis elution time (mins) and the y-axis represents absorbance (mAmps)

Figure 3 shows the chromatographic separation of heparin depolymerized with heparinases before and after reduction with NaBH_4 (signal in fine black UV at 234 nm, signal in thick black UV at 202-234 nm), wherein the x-axis elution time (mins) and the y-axis represents absorbance (mAmps)

EXAMPLES

The examples below are intended to illustrate various features of the invention. One skilled in the art will appreciate that the invention is not limited to the embodiments exemplified below

Example 1 General Description of Enzymatic depolymerization

The following is a general description on how enzymatic depolymerization is performed and could be used in the present invention

The enzymatic depolymerization is carried out for 48 hours at room temperature by mixing 50 μl of a solution containing 20 mg/ml of enoxaparin sodium to be assayed, 200 μl of a 100 mM acetic acid/NaOH solution at pH 7.0 containing 2 mM calcium acetate and 1 mg/ml of BSA with 50 μl of the stock solution of the 3 heparinases. The heparinases are stored at -30°C

The heparinases are in a buffer solution and the titer for each heparinase is 0.5 IU/ml (composition of the buffer solution: aqueous solution pH 7 of KH_2PO_4 at a concentration of 0.01 mol/l and supplemented with bovine serum albumin (BSA) at 2 mg/ml)

The reduction is carried out on 60 µl of the product depolymerized with the heparinases by adding 10 µl of a 30 g/l NaBH₄ solution in 100 mM sodium acetate prepared immediately before use

Example 2

- 5 NMR of Disaccharide 3 obtained according to the general description of Example 1

Proton spectrum in D₂O, 400 MHz, T=298K, δ in ppm 3.34 (1H dd, J=7 and 2Hz, H2) 3.72 (1H, t, J=8Hz, H6), 3.90 (1H, m H3), 4.03 (1H, s, H4), 4.20 (1H, d, J=8Hz, H6) 4.23 (1H t J=5Hz, H3), 4.58 (1H, m H2) 4.78 (1H m, H5), 5.50 (1H s, H1) 5.60 (1H, dd, J=6 and 1Hz, H1), 6.03 (1H, d J=5Hz, H4)]

10

Example 3

NMR of Tetrasaccharide 1 obtained according to the general description of Example 1

- 15 Proton spectrum in D₂O 400 MHz, T=298K, δ in ppm 3.15 (1H, s, H2), 3.25 (1H m H2'), 3.60 (1H m, H3"), between 3.70 and 4.70 (14H unresolved complex, H3/H4/H6, H2/H3/H4/H5 H4/H5/H6, H2/H3'), 4.75 (1H, m, H5) between 5.20 and 5.40 (2H, m, H1 and H1") 5.45 (1H m, H1"), 5.56 (1H, m, H1), 5.94 (1H, d, J=5Hz, H4)

20 Example 4

NMR of the Trisaccharide 1 obtained according to the general description of Example 1

- Spectrum in D₂O, 600 MHz, (δ in ppm) 3.28 (1H, m), 3.61 (1H t 7Hz) 3.79 (1H t, 7Hz), 3.95 (1H, d, 6Hz), 4.00 (1H, s), 4.20 (1H, m), 4.28 (2H m), 4.32 (1H d 4Hz) 4.41 (1H s), 4.58 (1H s) 4.61 (1H s), 4.90 (1H, broad s) 5.24 (1H s) 5.45 (1H s), 5.95 (1H, s)
- 25

Example 5

NMR of ΔGlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser, obtained according to the present invention

- Spectrum in D₂O 500 MHz (δ in ppm) 3.30 (1H, t, 7Hz), 3.34 (1H, t, 8Hz), 3.55 (1H, t, 7Hz), 3.60 (1H, t, 7Hz), between 3.63 and 3.85 (10H, m), 3.91 (2H, m), 3.96 (1H dd, 7 and 2Hz), between 4.02 and 4.10 (3H, m), 4.12 (1H
- 30

d 2Hz) 4 18 (1H m), 4 40 (1H, d, 6Hz) 4 46 (1H, d, 6Hz), 4 61 (1H, d, 6Hz)
5 29 (1H d 3Hz) 5 85 (1H d 3Hz)

Example 6 Principle of the Quantification

The 1,6-anhydro content in the chromatogram obtained with the reduced
5 solution is determined by the normalized area percentage method

The molar absorptivity coefficient of the unsaturated uronic acids is taken as
constant, and consequently the response factor of a polysaccharide is
proportional to its molecular mass

In the methods according to the invention the widely accepted hypothesis
10 that all the unsaturated oligosaccharides contained in the mixture have the
same molar absorptivity, equal to $5500 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$ is made

The two coeluted 1 6-anhydro residues disaccharides 1 and 2, are integrated
together

It is therefore possible to determine the percentage by weight of all the
15 constituents of the depolymerized mixture in the starting unfractionated
heparin or fractionated heparin, for example constituents such as 1 6-anhydro
derivatives or acetylated sugar derivatives For the four 1 6-anhydro
derivatives, namely disaccharide 1, disaccharide 2, disaccharide 3 and
tetrasaccharide 1, that correspond to the peaks 7 8 13 and 19 the following

$$\% w/w_{7+8} = 100 \frac{443 (\text{Area}_7 + \text{Area}_8)}{\sum \text{Mw}_x \text{Area}_x}$$

$$\% w/w_{13} = 100 \frac{545 \text{Area}_{13}}{\sum \text{Mw}_x \text{Area}_x}$$

$$\% w/w_{19} = 100 \frac{1210 \text{Area}_{19}}{\sum \text{Mw}_x \text{Area}_x}$$

20 percentages by weight were obtained

Area_7 , Area_8 , Area_{13} and Area_{19} correspond to the areas of each of the peaks
7, 8, 13, and 19 The molar masses of each of these 4 compounds are 443,
443, 545 and 1210 respectively $\sum \text{Mw}_x \text{Area}_x$ corresponds to the ratio of

the area of each peak of the chromatogram by the molar mass of the corresponding product

If M_w is the mean mass of the low-molecular-weight heparin studied, the percentage of oligosaccharide chains ending with a 1,6-anhydro ring is

5 obtained in the following manner

$$\%_{1,6\text{anhydro}} = M_w \left(\frac{\% \text{ w/w}_{7+8}}{443} + \frac{\% \text{ w/w}_{13}}{545} + \frac{\% \text{ w/w}_{19}}{1210} \right)$$

Similarly the percentage by weight of other components in a sample of material chosen from unfractionated heparins and fractionated heparins can be determined

10 The exact molecular mass is attributed to all the identified peaks on the chromatograms (see Table 1)

Table 1

Oligosacchande	Oligosaccharide after reduction	Molecular mass
1	1	741
2	20	401
3	3	734
4	21	461
5	22	461
6	23	503
7	7	443
8	8	443
9	24	503
10	25	563
11	26	563
12	27	563
13	13	545

14	28	605
15	29	1066
16	30	665
17	31	965
18	32	1168
19	19	1210

The following is the nomenclature of the saccharides that corresponds with the peak numbers of Figures 2 and 3

- 1
- Δ GlcA β_{1-3} Gal β_{1-3} Gal β_{1-4} Xyl β_1 -O-Ser
- 5
- 2
- 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucopyranosyl sodium salt
- 3
- Δ GlcA β_{1-3} Gal β_{1-3} Gal β_{1-4} Xyl β_1 -O-CH₂-COOH
- 4
- 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-galactopyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucopyranose disodium salt
- 10
- 5
- 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl sodium salt
- 6
- 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl disodium salt
- 7
- 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucopyranose disodium salt (disaccharide 1)
- 15
- 8
- 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-mannopyranose disodium salt (disaccharide 2)
- 20
- 9
- 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucopyranosyl disodium salt
- 10
- 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-galactopyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido- β -O-sulfo- β -D-glucopyranose trisodium salt

- 11 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- β -D-glucopyranosyl trisodium salt
- 12 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl trisodium salt
- 5 13 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-4-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucopyranose trisodium salt (Disacchande 3)
- 14 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl trisodium salt
- 10 15 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-3-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl) pentasodium salt
- 16 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl tetrasodium salt
- 15 17 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl) hexasodium salt
- 20 18 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronic acid hexasodium salt
- 19 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-sulfamido- β -D-mannopyranose, hexasodium salt (tetrasacchande 1)
- 25 20 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucitol sodium salt

- 21 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucitol disodium salt
- 22 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucitol disodium salt
- 5 23 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol disodium salt
- 24 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucitol disodium salt
- 25 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-galactopyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- β -D-glucitol trisodium salt
- 10 26 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol trisodium salt
- 27 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucitol trisodium salt
- 15 28 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol trisodium salt
- 29 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-3-O-sulfo- α -D-glucitol) pentasodium salt
- 20 30 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol trisodium salt
- 31 4-deoxy- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucitol) hexasodium salt
- 25 32 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-ene-pyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronic acid hexasodium salt (form reduced with NaBH₄)

Abbreviations Used

IdoA α -L-Idopyranosyluronic acid,

GlcA β -D-Glucopyranosyluronic acid,

5 Δ GlcA. 4,5-unsaturated acid 4-deoxy- α -L-*threo*-hex-ene-pyranosyluronic acid

Gal D-Galactose,

Xyl xylose,

GlcNAc 2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucopyranose,

GlcNS 2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranose,

10 2S 2-O-sulfate,

3S 3-O-sulfate

6S 6-O-sulfate

The present invention may be embodied in other specific forms without departing from the spirit or essential attributes thereof

What is claimed is

1 A method for quantifying the amount of components in a sample of material selected from unfractionated heparins and fractionated heparins, comprising

- 5 (a) depolymerizing said sample by an enzymatic method, and
(b) detecting the quantity of the components in the depolymerized sample of step (a) by high-performance liquid chromatography

2 The method as claimed in claim 1 wherein the enzymatic
10 method is carried out using at least one heparinase

3 The method as claimed in claim 1 wherein the enzymatic method is carried out using a mixture of heparinase 1 (EC 4.2.2.7), heparinase 2 (heparin lyase II) and heparinase 3 (EC 4.2.2.8)

4 The method as claimed in claim 1, wherein the fractionated
15 heparin is enoxaparin sodium

5 The method as claimed in claim 1, wherein the high performance liquid chromatography used in step (b) is anion-exchange chromatography

6 The method as claimed in claim 1, wherein the high
20 performance liquid chromatography used in step (b) is strong anion exchange chromatography (SAX)

7 The method as claimed in claim 6, wherein the strong anion exchange chromatography is carried out using a Sphensorb® SAX column

8 The method as defined in claim 1, wherein the high-
25 performance liquid chromatography is carried out in a mobile phase which is transparent to UV light with wavelengths from about 200 nm to about 400 nm

9 The method as claimed in claim 1, wherein the high-
performance liquid chromatography is carried out in a mobile phase which comprises at least one salt chosen from sodium perchlorate
30 methanesulfonate salts, and phosphate salts

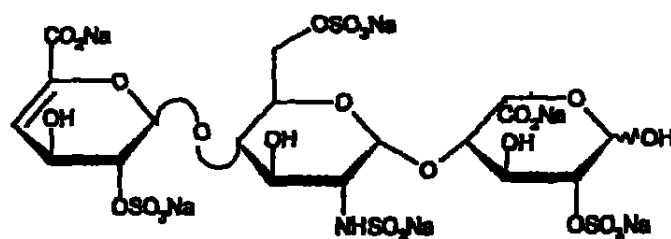
10 The method as claimed in claim 1, wherein the high-performance liquid chromatography is carried out in a mobile phase which comprises sodium perchlorate salts

11 The method as claimed in claim 6, wherein the strong anion
5 exchange chromatography is carried out at a pH of about 2.0 to about 6.5

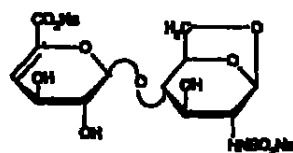
12 The method as claimed in claim 6 wherein the strong anion exchange chromatography is carried out at a pH of about 3

13 The method as claimed in claim 1, wherein the mobile phase comprises a sodium perchlorate solution that is maintained at about pH 3.0

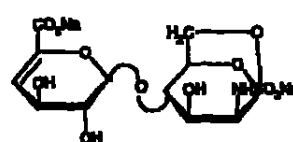
10 14 The method as claimed in claim 1 wherein the depolymerized sample comprises at least one oligosaccharide chain selected from any one of the following



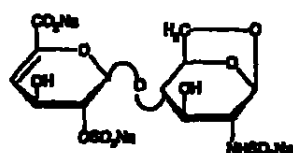
trisaccharide 1



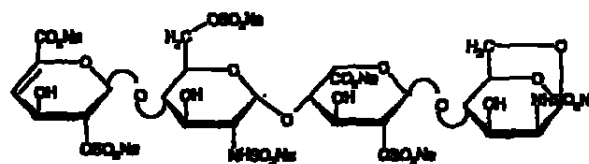
disaccharide 1



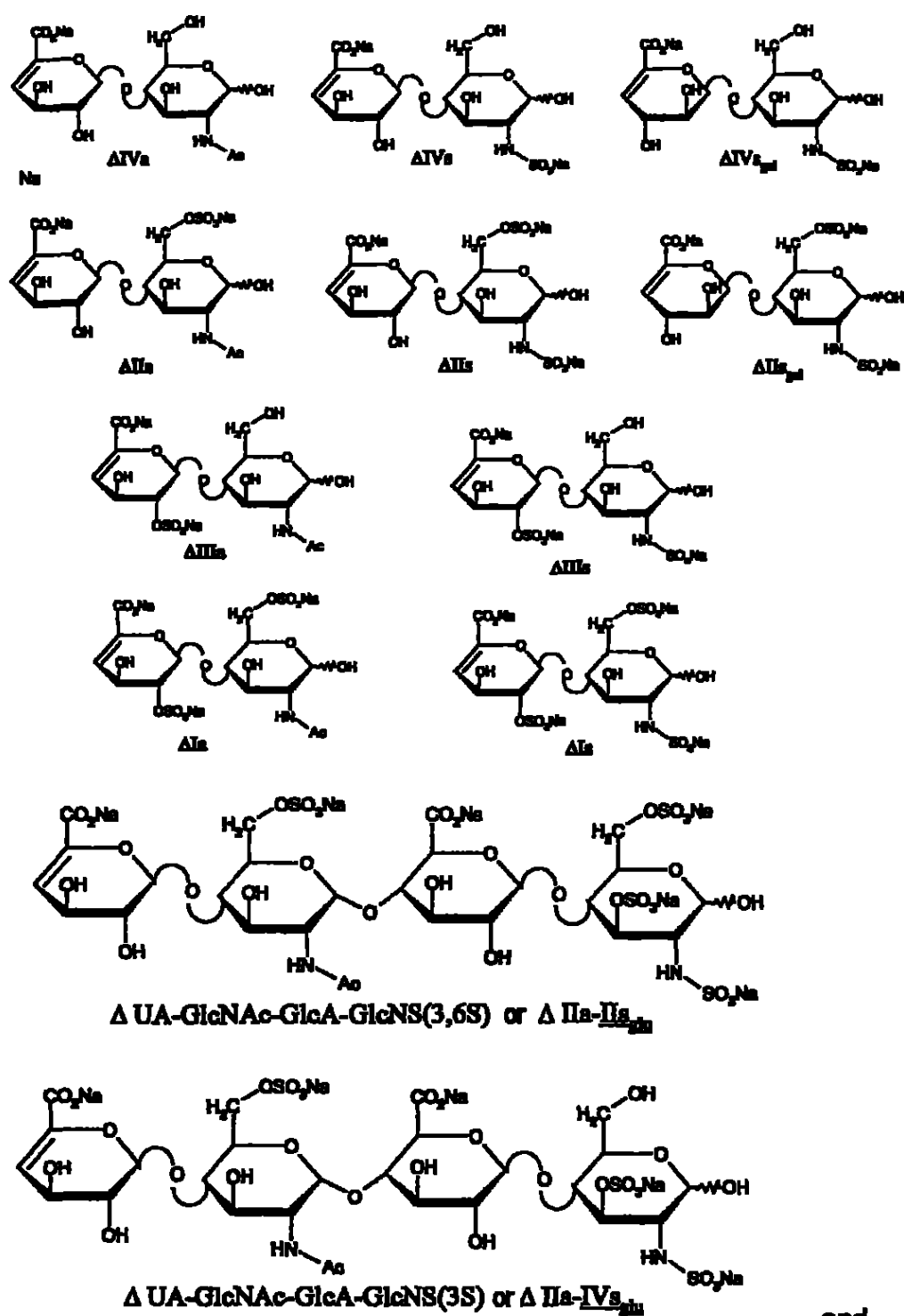
disaccharide 2



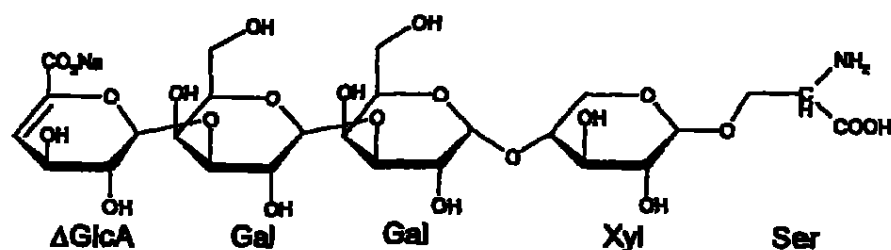
disaccharide 3



tetrasaccharide 1

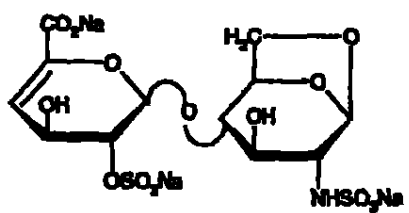
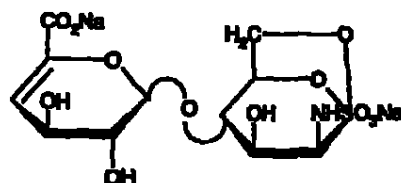
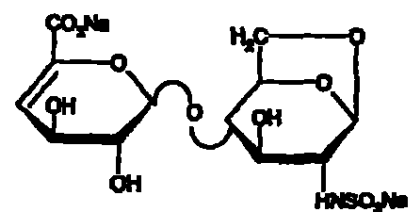


24

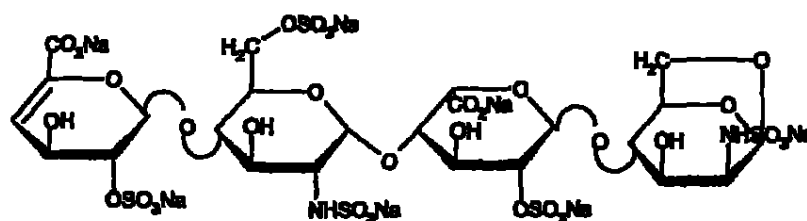


15 The method as claimed in claim 1 wherein the depolymerized sample comprises at least one oligosaccharide chain whose end is modified
5 with a 1,6-anhydro bond

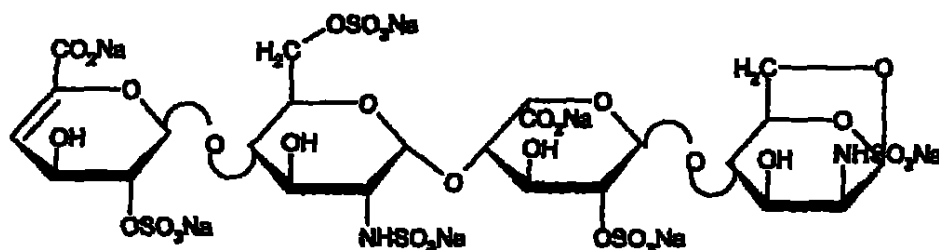
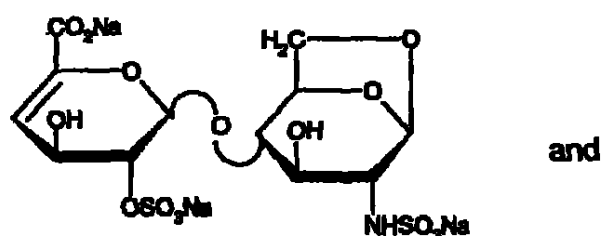
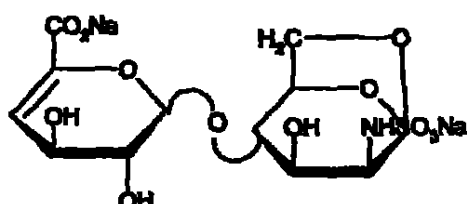
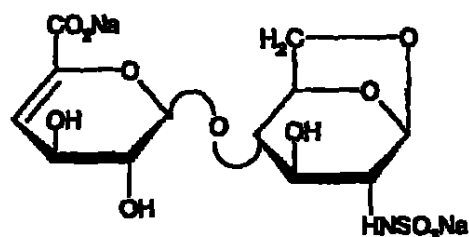
16 The method as claimed in claim 15 wherein the at least one oligosaccharide chain is chosen from any of the following



or



17 The method as claimed in claim 4, wherein the depolymerized sample comprises at least one 1,6-anhydro residue chosen from any of the following



5

18 The method as claimed in claim 17, wherein the at least one 1,6-anhydro residue ranges from 15 % to 25 % of the weight average molecular weight of the sample

19 The method as claimed in claim 1 wherein the components
10 detected in the depolymerized sample of step (b) are acetylated sugars

20 The method as claimed in claim 19, wherein the acetylated
sugars are selectively detected by subtracting an absorbance measured at a
wavelength at which both acetylated and nonacetylated sugars absorb from
an absorbance measured at a wavelength at which acetylated but not
5 nonacetylated sugar absorbs

21 The method as claimed in claim 19, wherein the acetylated
sugars detected are selected from acetylated oligosaccharides ΔIVa ΔIIa
 $\Delta IIIa$ ΔIa , $\Delta IIa-IVs_{glu}$, and $\Delta IIIa-IIIs_{glu}$

22 A method for quantifying the amount of 1,6-anhydro residues in
10 a sample of enoxaparin sodium comprising

(a) depolymerizing said sample using a mixture of heparinase 1
(EC 4 2 2 7) heparinase 2 (heparin lyase II) and heparinase 3 (EC 4 2 2 8)
and

(b) detecting the quantity of the 1,6-anhydro residues in the
15 depolymerized sample of step (a) by high-performance liquid
chromatography

23 A method as claimed in claim 22 wherein the quantity of the
1,6-anhydro residues range from 15 % to 25 % of the mean oligosaccharide
molecular weight of the sample

20 24 A method for quantifying the amount of components in a sample
of material chosen from unfractionated heparins and fractionated heparins,
comprising

(a) depolymerizing said sample by an enzymatic method and

(b) reducing the depolymerized sample of step (a)

25 (c) detecting the quantity of the components in the reduced sample of (b)
by high-performance liquid chromatography

25 The method as claimed in claim 24, wherein the enzymatic
method is carried out using at least one heparinase

26 The method as claimed in claim 24 wherein enzymatic method
30 is carried out using a mixture of heparinase 1 (EC 4.2.2.7) heparinase 2
(heparin lyase II), and heparinase 3 (EC 4 2 2 8)

27 The method as claimed in claim 24, wherein reducing the depolymerized sample of step (a) is carried out by exposure to a reducing agent.

28 The method as claimed in claim 27, wherein the reducing agent
5 is NaBH_4 or an alkali metal salt of the borohydride anion

29 The method as claimed in claim 24 wherein the fractionated heparin is enoxaparin sodium

30 The method as claimed in claim 27, wherein the reducing reduces the reducing ends of enoxaparin sodium which are not in the 1,6-
10 anhydro form

31 The method as claimed in claim 24 wherein the high performance liquid chromatography used in step (c) is anion-exchange chromatography

32 The method as claimed in claim 24, wherein the high
15 performance liquid chromatography used in step (c) is strong anion exchange chromatography (SAX)

33 The method as claimed in claim 32, wherein the strong anion exchange chromatography is carried out using a Spherisorb® SAX column

34 The method as defined in claim 24, wherein the high-
20 performance liquid chromatography is carried out in a mobile phase which is transparent to UV light with wavelengths from about 200 nm to about 400 nm

35 The method as claimed in claim 24 wherein the high- performance liquid chromatography is carried out in a mobile phase which comprises at least one salt chosen from sodium perchlorate
25 methanesulfonate salts, and phosphate salts

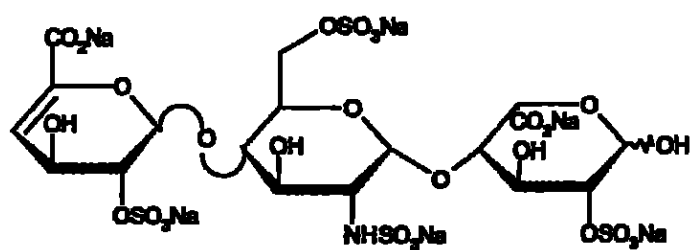
36 The method as claimed in claim 24, wherein the high- performance liquid chromatography is carried out in a mobile phase which comprises sodium perchlorate salts

37 The method as claimed in claim 32, wherein the strong anion
30 exchange chromatography is carried out at a pH of about 2.0 to about 6.5

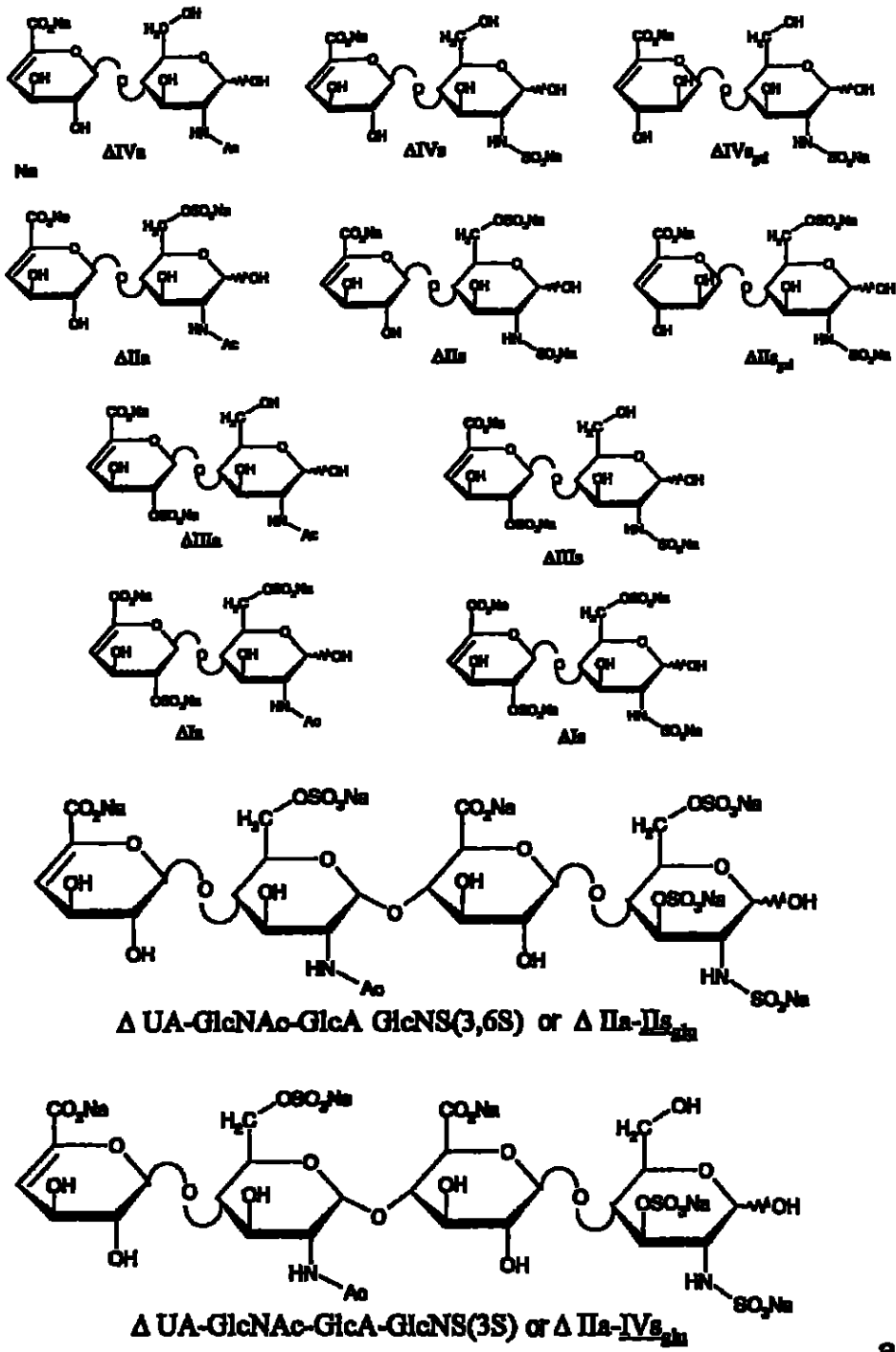
38 The method as claimed in claim 32 wherein the strong anion exchange chromatography is carried out at a pH of about 3

39 The method as claimed in claim 24, wherein the high performance liquid chromatography utilizes a mobile phase comprising a
5 sodium perchlorate solution that is maintained at about pH 3.0

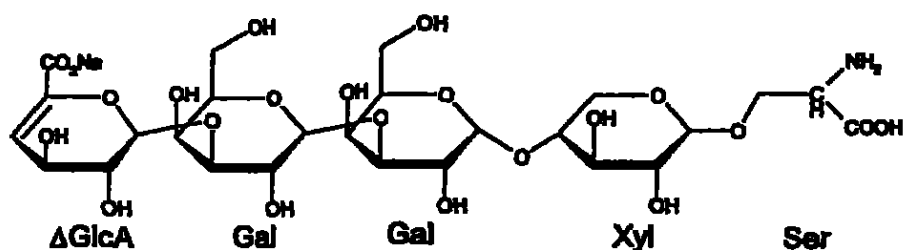
40 The method as claimed in claim 28, wherein the depolymerized sample comprises at least one oligosaccharide chain selected from any of the following



trisaccharide 1



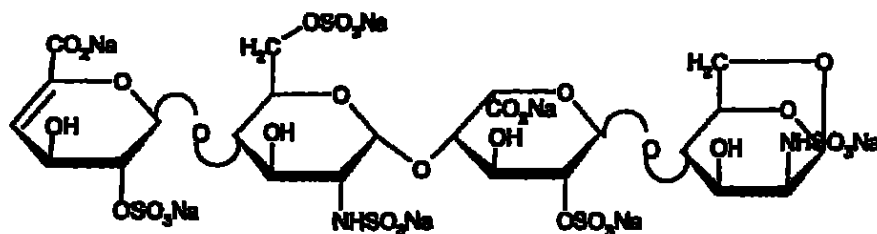
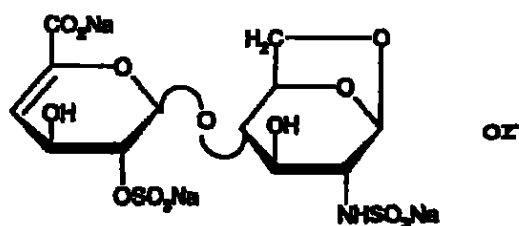
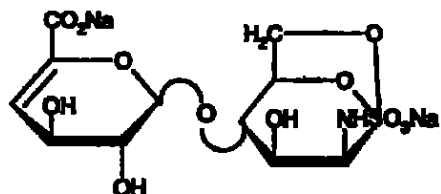
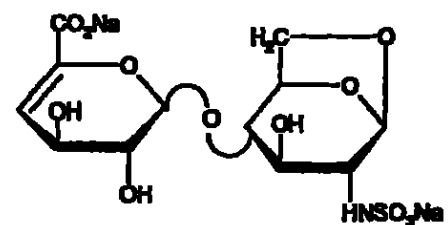
30



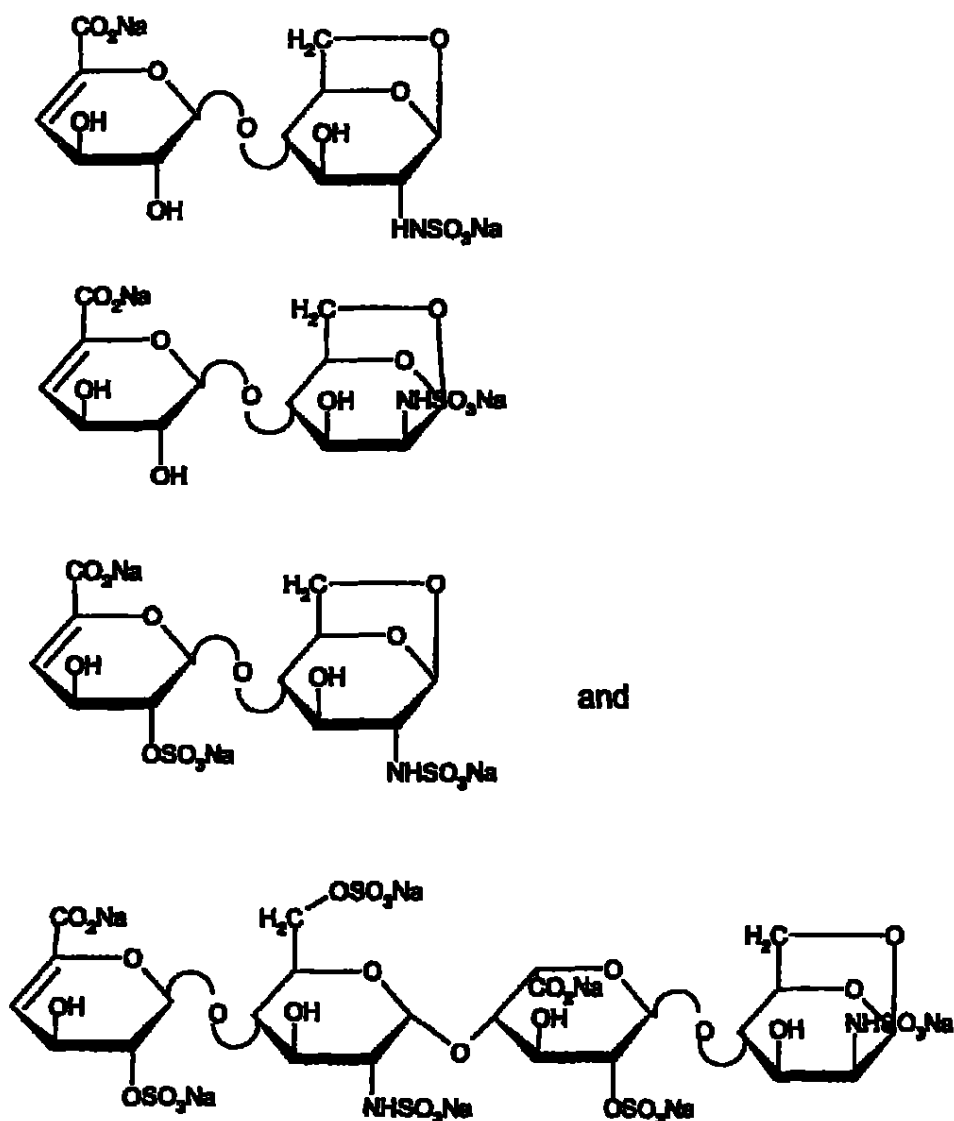
wherein the oligosaccharide chain is in its reduced form

41 The method as claimed in claim 24 wherein the depolymerized sample comprises at least one oligosaccharide chain whose end is modified with a 1 6-anhydro bond

42 The method as claimed in claim 41, wherein the at least one oligosaccharide chain is chosen from any of the following



43 The method as claimed in claim 29, wherein the depolymerized sample comprises a mixture of 1,6-anhydro residues comprising



44 The method as claimed in claim 43 wherein the mixture of 1,6-anhydro residues range from 15% to 25% of the weight average molecular weight of the sample

45 The method as claimed in claim 24, wherein the components detected in the depolymerized sample of step (b) are acetylated sugars

46 The method as claimed in claim 45, wherein the sugars are selectively detected by subtracting an absorbance measured at a wavelength

at which both acetylated and nonacetylated sugars absorb from an absorbance measured at a wavelength at which acetylated but not nonacetylated sugar absorbs

47 The method as claimed in claim 45 wherein the acetylated
5 sugars detected are selected from acetylated oligosaccharides ΔIVa , ΔIIa , $\Delta IIIa$, ΔIa , $\Delta IIa-IVs_{glu}$, and $\Delta IIIa-IIIs_{glu}$

48 A method for quantifying the amount of 1,6-anhydro residues in a sample of enoxaparin sodium, comprising

- (a) depolymerizing said sample using a mixture of heparinase 1
10 (EC 4 2 2 7) heparinase 2 (heparan lyase II), and heparinase 3 (EC 4 2 2 8),
(b) reducing the depolymerized sample of step (a) and
(b) detecting the quantity of the 1,6-anhydro residues in the reduced sample of step (b) by high-performance liquid chromatography

49 A method as claimed in claim 48, wherein the quantity of the
15 1,6-anhydro residues range from 15% to 25% of the weight average molecular weight of the sample

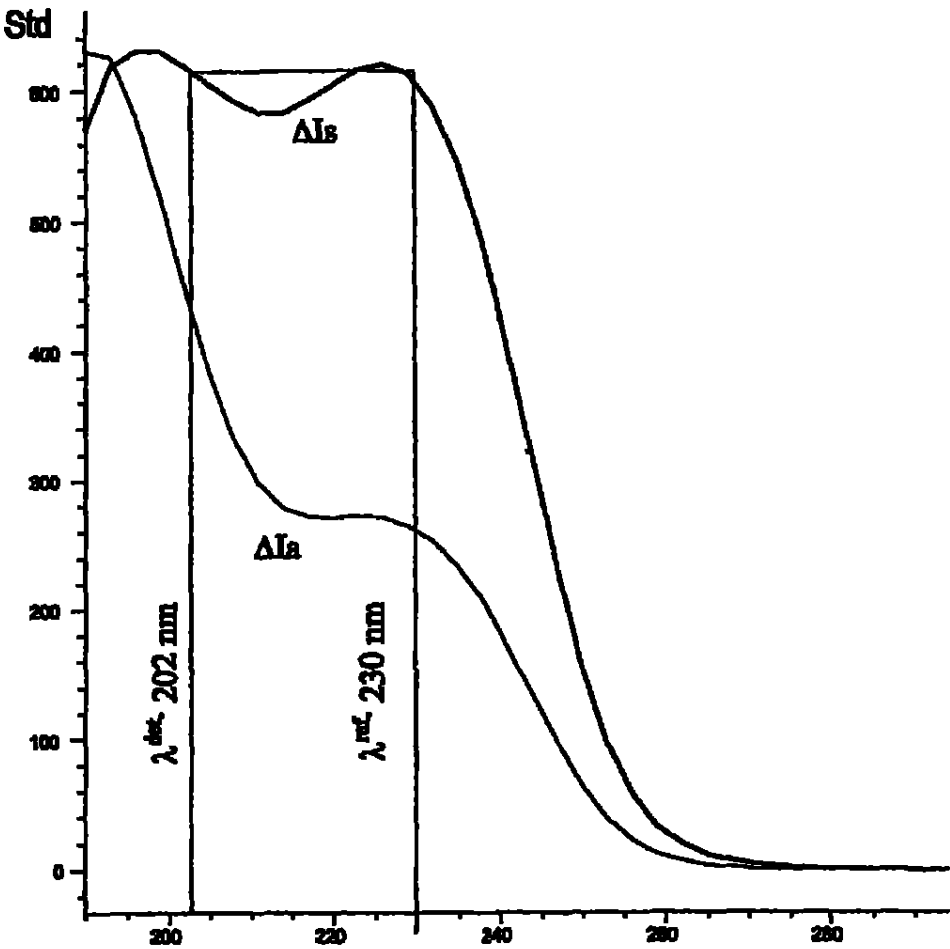


Figure 1

2/3

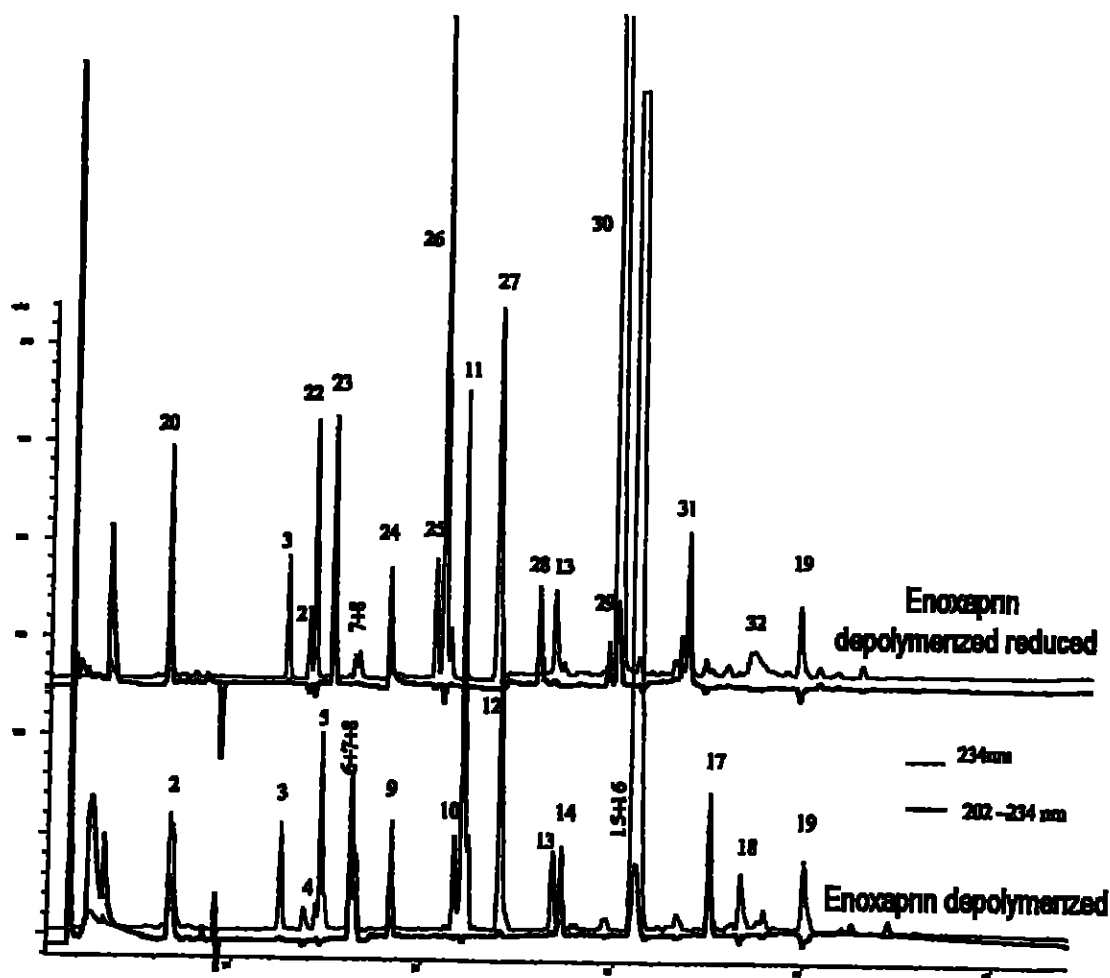
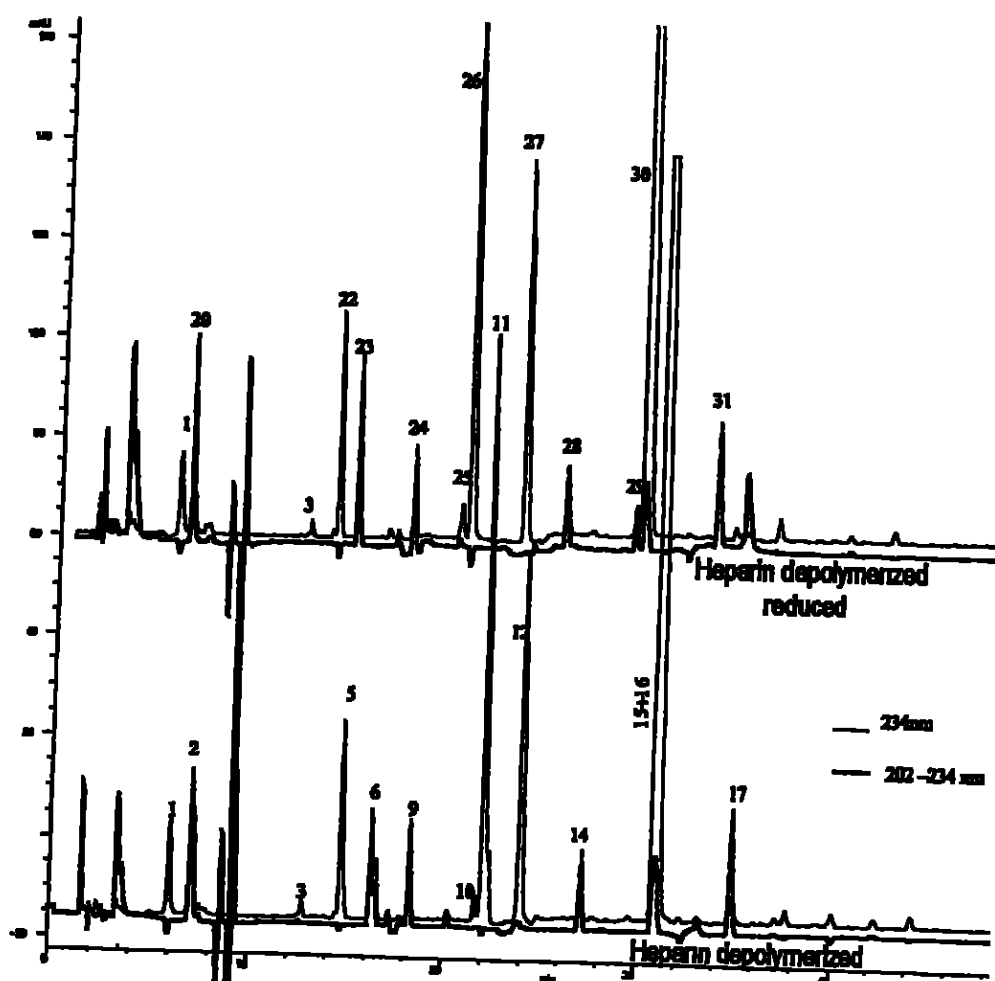


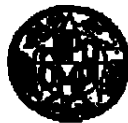
Figure 2

3/3

**Figure 3**

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN
MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



PCT

(10) Número de publicación
internacional

WO 2005/090409 A1

(43) Fecha de publicación internacional
29 Septiembre 2005 (29 09 2005)

- (51) Clasificación Internacional de Patentes⁷ C08B 37/00
- (21) Número de solicitud internacional PCT/EP2005/003720
- (22) Fecha de presentación internacional 22 Marzo 2005 (22 03 2005)
- (25) Idioma de la presentación Inglés
- (26) Idioma de la publicación Inglés
- (30) Datos de prioridad 04290790 7 24 Marzo 2004 (24 03 2004) EP
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto EE.UU.) AVENTIS PHARMA, S.A. [FR/FR] 20 Avenue Raymond Aron F-92160 ANTONY (FR)
- (72) Inventores a
- (75) Inventores / Solicitantes (solamente para EE.UU.) MOURIER, Pierre [FR/FR] 1 rue Etienne Mètul, F-94220 CHARENTON LE PONT (FR) VISKOV Christian [FR/FR], 3 rue du Béam F-91130 RIS ORANGIS (FR)
- (74) Agente ROUSSEAU Pierick AVENTIS PHARMA S.A. Patent Department, 20 Avenue Raymond Aron F-92165 ANTONY CEDEX (FR)

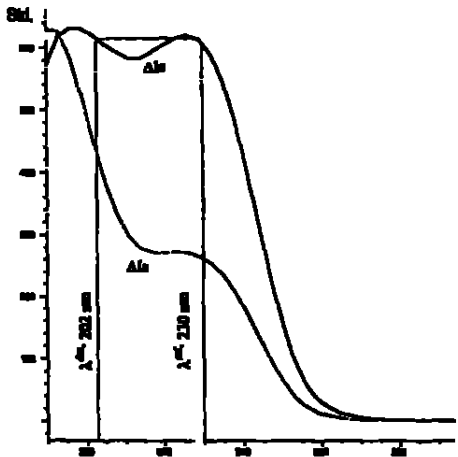
(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección nacional disponible) AE AG AL AM AT AU AZ, BA, BB, BG BR, BW BY BZ, CA, CH CN CO CR, CU CZ, DE DK, DM, DZ, EC EE, EG, ES FI GB GD GE GH GM HR, HU ID IL, IN IS JP KE KG KP KR, KZ, LC LK, LR, LS LT LU LV MA, MD MG MK MN MW MX, MZ, NA, NI NO NZ, OM PG PH PL, PT RO RU SC SD SE SG SK, SL, SM SY TJ TM TN TR, TT TZ, UA, UG US UZ, VC VN YU ZA, ZM ZW

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección regional disponible) ARIPO (BW GH GM KE LS MW MZ, NA, SD SL, SZ, TZ, UG ZM ZW) Euroasiática (AM, AZ, BY KG KZ, MD RU TJ TM) Europea (AT BE BG CH CY CZ, DE DK, EE, ES FI FR GB GR, HU IE IS IT LT LU MC NL PL, PT RO SE SI SK, TR) OAPI (BF BJ CF CG CI CM GA, GN GQ GW ML, MR, NE SN TD TG)

Publicada
— Con informe de búsqueda internacional

[Sigue en la página siguiente]

(54) Título MÉTODO PARA DETERMINAR CUANTITATIVAMENTE LOS ESPECÍFICOS QUE CONSTITUYEN
HEPARINAS O LAS HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR USANDO HPLC



(57) Resumen Un método para analizar heparinas o heparinas de bajo peso molecular caracterizado porque la muestra que se va a ensayar se despolimeriza por la acción de heparinasas y después cuando resulte apropiado el despolimerizado obtenido se reduce y después se lleva a cabo un análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución

WO 2005/090409 A1

MÉTODO PARA DETERMINAR CUANTITATIVAMENTE LOS ESPECÍFICOS QUE CONSTITUYEN HEPARINAS O LAS HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR USANDO HPLC

Una realización de la presente invención es un método para detectar o
5 cuantificar la cantidad de componentes que tiene una estructura 1-6 anhidro o de azúcares acetilados en una muestra de heparinas fraccionadas o de heparinas sin fraccionar

Las heparinas son agentes activos desde un punto de vista biológico de la familia de los glucosaminoglicanos extraídas de fuentes naturales y que tienen
10 propiedades anticoagulantes y antitrombóticas valiosas. En particular resultan útiles en el tratamiento de trombosis venosas postoperatorias

Para producir heparinas de bajo peso molecular (LMWH) a partir de una heparina de partida las cadenas heparínicas de polisacárido más largas deben degradarse en cadenas más cortas con un peso molecular menor. Esto puede
15 realizarse tanto mediante despolimerización química como enzimática. El resultado puede ser unos pesos moleculares medios para las cadenas de polisacárido de LMWH de aproximadamente 5 000 Da. Las LMWH al igual que la heparina sin fraccionar inhiben la coagulación mediante la unión a ATIII en secuencias de pentasacárido particulares distribuidas a lo largo de algunas de las cadenas de polisacárido

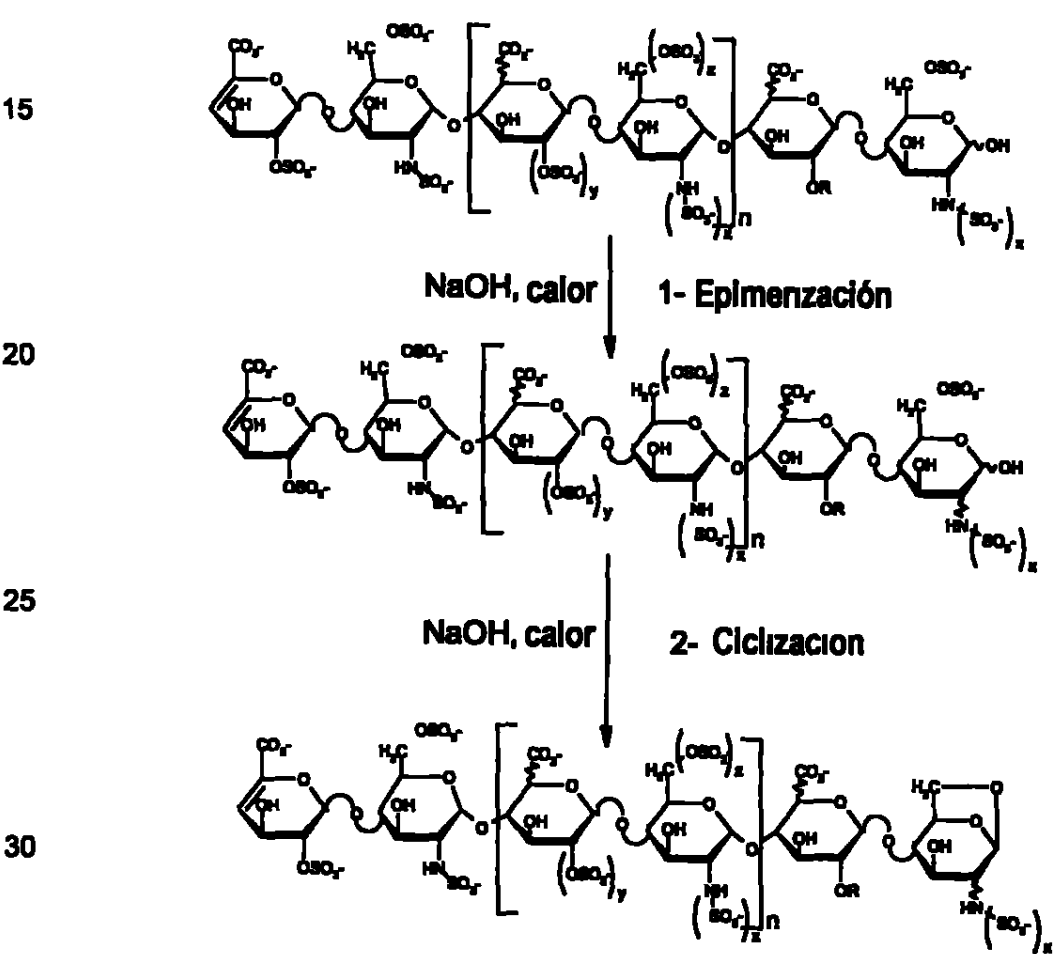
20 Cada fabricante de LMWH de un producto autorizado utiliza un procedimiento de despolimerización distinto. A no ser que dos fabricantes utilicen el mismo procedimiento esta diferencia en el procedimiento resulta en LMWH con estructuras químicas distintas y por lo tanto con actividad farmacológica distinta y con indicaciones autorizadas distintas para su utilización clínica. Las LMWH resultantes se
25 diferencian estructuralmente por el procedimiento de despolimerización utilizado en su fabricación (R J Linhardt et al *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1999 25(3 Sup) 5-16). Como resultado las LMWH son más heterogéneas que la heparina. Cada procedimiento diferente produce modificaciones estructurales muy complejas y únicas de las cadenas de polisacárido. Estas modificaciones incluyen diferencias en las
30 longitudes de las cadenas y en las secuencias de las cadenas así como en huellas estructurales. Por consiguiente las diferentes LMWH pueden tener perfiles farmacológicos distintos e indicaciones clínicas autorizadas distintas.

La enoxaparina sódica está disponible a partir de Aventis y se vende en los Estados Unidos en la forma de inyección de enoxaparina sódica bajo la marca
35 registrada Lovenox® (Clexane® en otros países). En general la enoxaparina sódica se

obtiene mediante la degradación alcalina del éster de bencilo de la heparina obtenido a partir de mucosa intestinal porcina Su estructura se caracteriza por ejemplo por un grupo ácido 2-O-sulfo-4-enepiranosurónico en el extremo no reductor y por una 2-N 6-O-disulfo-D-glucosamina en el extremo reductor de la cadena El peso molecular medio es aproximadamente 4 500 daltons La distribución del peso molecular es

<2 000 daltons	≤20%
2 000 a 8 000 daltons	≥68%
>8 000 daltons	≤18%

En la fabricación de la enoxaparina sódica se produce una desulfatación en la posición 6-O de la glucosamina que da lugar a la formación de derivados denominados 1,6 anhidro (Solicitud de Patente Internacional WO 01/29055) como se muestra más abajo



Este tipo de derivado sólo se obtiene en el caso de cadenas de oligosacárido cuya glucosamina terminal está sulfatada en la posición 6-O

El porcentaje de cadenas de oligosacárido cuyo extremo está modificado con

un enlace 1 6-anhidro es una característica estructural de la mezcla de oligosacáridos de la enoxapanna sódica y debería ser posible determinarlo. En base al conocimiento actual entre el 15% y el 25% de los componentes de la enoxapanna sódica tienen una estructura 1 6-anhidro en el extremo reductor de su cadena.

5 Por lo tanto una realización de la presente invención proporciona un método para analizar hepannas sin fraccionar y hepannas fraccionadas. Las hepannas fraccionadas como se emplea en esta memoria se refiere a cualquier hepanna que se somete a despolimerización por ejemplo heparinas de bajo peso molecular (LMWH) que incluyen enoxapanna sódica y cualquier LMWH para la que se busque
10 autorización por una autoridad reguladora de acuerdo con una solicitud que cite Lovenox®/ Clexane® (inyección de enoxapanna sódica) como el medicamento registrado.

En una realización el método de análisis de acuerdo con la invención es el siguiente.

15 La muestra que se va a ensayar se despolimeriza mediante la acción de hepannasas y después cuando resulte apropiado el despolimerizado obtenido se reduce y después se lleva a cabo el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Por lo tanto el método tal y como se ha definido más arriba se caracteriza porque el despolimerizado se analiza para detectar la presencia de cadenas de oligosacárido cuyo extremo está modificado con un enlace 1 6-anhidro ("grupos 1 6-anhidro").

En una realización relacionada la muestra que se va a ensayar se despolimeriza de manera exhaustiva en primer lugar con una mezcla de hepannasas por ejemplo hepannasa 1 (EC 4.2.2.7) hepannasa 2 (hepanna lisa II) y hepannasa 3 (EC 4.2.2.8) por ejemplo con 0.5 units/ml de cada hepannasa (Estas enzimas están comercializadas por el grupo Grampian Enzymes).

Por lo tanto un objeto de la invención es un método para analizar hepannas sin fraccionar o hepannas fraccionadas que comprende las etapas siguientes.

- 30 (a) despolimerización de la muestra por la acción de heparinasas
(b) cuando resulte apropiado reducción del despolimerizado
(c) analizar la muestra de la etapa (a) o (b) mediante cromatografía líquida de alta resolución.

En una realización el objeto de la invención es el método que se ha definido más arriba en el que las hepannasas están en la forma de una mezcla de hepannasa

1 (EC 4 2 2 7) heparinasa 2 (heparinasa II) y heparinasa 3 (EC 4 2 2 8)

El despolimerizado preparado de esta manera puede tratarse entonces para reducir los extremos reductores que no están en la forma 1,6-anhidro (productos descritos en la solicitud de patente internacional WO 01/72762). En una realización, el despolimerizado puede tratarse con una disolución de NaBH_4 en acetato sódico para reducir los extremos reductores que no están en la forma 1,6-anhidro. Finalmente, con el fin de poder cuantificar los disacáridos 1 y 2 descritos más abajo, la muestra de la heparina de bajo peso molecular despolimerizada con heparinasas puede reducirse por la acción de un agente reductor como NaBH_4 .

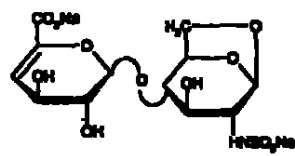
10 Por lo tanto, un objeto de la invención es el método que se ha definido más arriba en el que se reduce la heparina despolimerizada.

Un objeto de la invención es, de manera adicional, el método que se ha definido más arriba en el que el agente reductor es NaBH_4 . También pueden utilizarse otras sales de metales alcalinos de borohidruro, tales como litio o potasio.

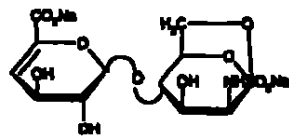
15 Los métodos de ensayo de acuerdo con la invención hacen posible diferenciar de manera clara la enoxapanna sódica de otras heparinas con bajo peso molecular que no contienen derivados 1,6-anhidro. Por el contrario, los métodos de la invención hacen posible asegurar que las heparinas con bajo peso molecular no tienen las características físico-químicas de la enoxapanna sódica y que, por lo tanto, son de naturaleza diferente.

Los métodos de acuerdo con la invención pueden aplicarse, por ejemplo, al procedimiento industrial durante el control de las muestras en el procedimiento con el fin de proporcionar la estandarización del procedimiento para la fabricación de enoxapanna sódica y para obtener lotes uniformes.

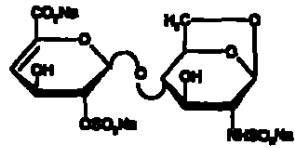
25 Después de la despolimerización enzimática y de la reducción opcional de los extremos reductores, los derivados 1,6-anhidro de la enoxapanna sódica existen en 4 formas esenciales, es decir, disacárido 1, disacárido 2, disacárido 3 y tetrasacárido 1. Por lo tanto, un objeto de la invención es también el método que se ha descrito más arriba en el que los restos 1,6-anhidro obtenidos durante la reacción de despolimerización incluyen los siguientes:



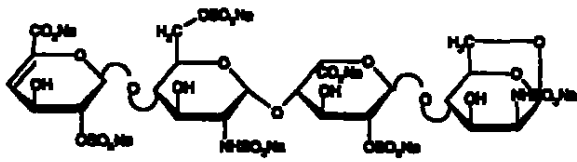
disacárido 1



disacárido 2



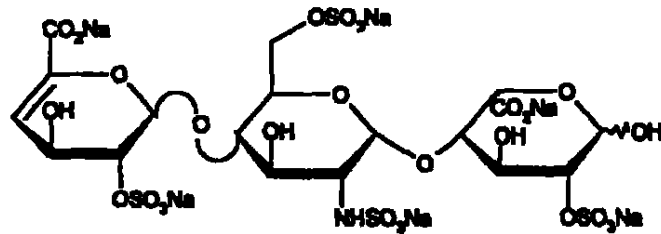
disacárido 3



tetrasacárido 1

10 Todos los oligosacándos o polisacándos que contienen el extremo 1 6-anhidro en la unidad del disacándos terminal y que no poseen un grupo sulfato en la posición 2 O del ácido urónico de dicho disacándos terminal se despolimerizan completamente con las heparinasas y están en la forma de los disacándos 1 y 2 Por otra parte cuando el sacándos terminal contiene un grupo sulfato en la posición 2-O del ácido urónico y cuando éste está en la forma manosamina el derivado 1 6-anhidro está en la forma de tetrasacándos 1 (forma resistente a heparinasas)

15 El trisacándos 1 (véase más abajo) también puede estar presente en la mezcla Se obtiene a partir de otro procedimiento de degradación que da lugar a la estructura que aparece más abajo (fenomeno de peeling observado durante la despolimerización química de la enoxapanna sódica)



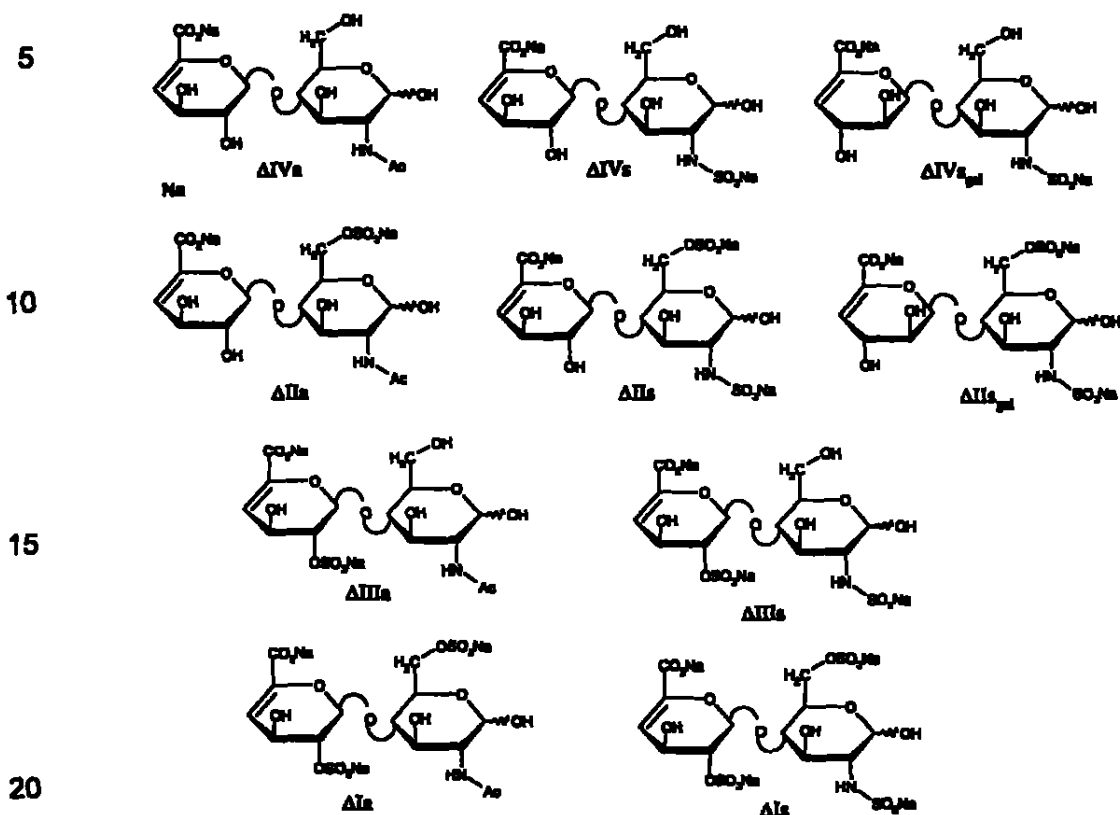
trisacárido 1

25 Los otros constituyentes de la mezcla no son sólo característicos de la enoxapanna sódica Por supuesto son los 8 disacándos elementales de la cadena de heparina Estos 8 disacándos elementales están comercializados entre otros por la empresa Sigma

30 Se identificaron otros disacándos en la mezcla mediante el método de acuerdo con la invención los disacándos $\Delta\text{IIS}_{\text{gal}}$ y $\Delta\text{IVS}_{\text{gal}}$ que tienen como origen la desulfatación alcalina de la posición 2-O de $-\text{IdoA}(2\text{S})\text{GlcNS}(6\text{S})-$ y de $-\text{IdoA}(2\text{S})$

35

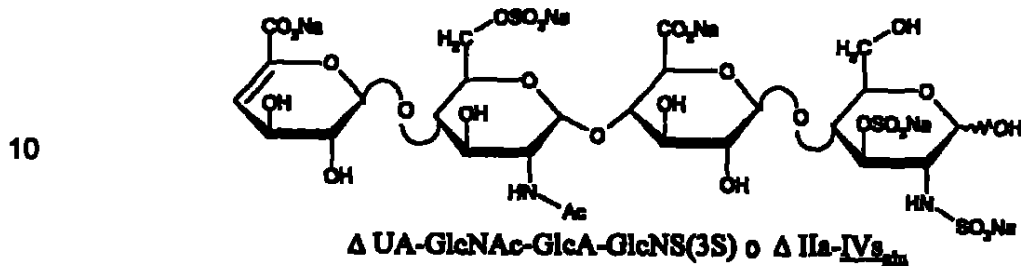
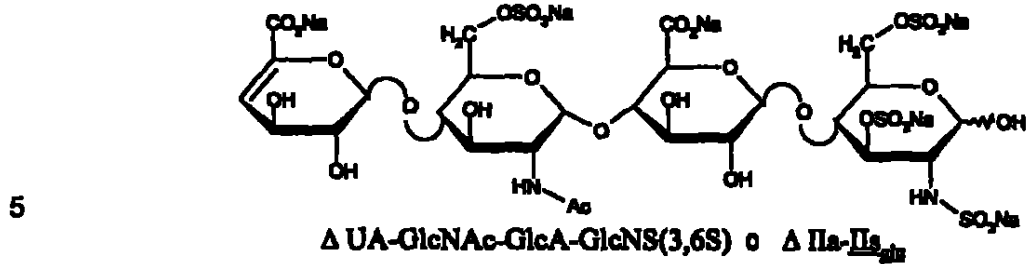
GlcNS- que da lugar a la formación de 2 ácidos galacturónicos. Éstos no están presentes habitualmente en la estructura original de la heparina (U M Desai et al Arch Biochem Biophys 306 (2) 461-468 (1993))



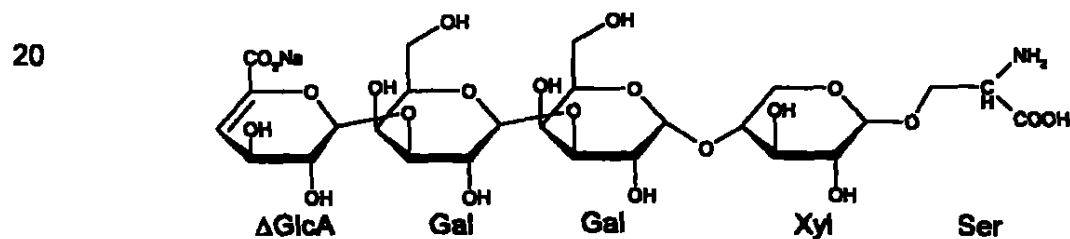
Los oligosacáridos que contienen glucosaminas sulfatadas en la posición 3-O resisten la rotura por las heparinasas y permanecen presentes en la forma de tetrasacáridos

25 En el caso de la mayoría de las heparinas con bajo peso molecular la heparina se extrae a partir de mucosa de cerdo y estos tetrasacáridos principales están representados más abajo. Estos tetrasacáridos son resistentes a la despolimerización enzimática y reflejan las secuencias que tienen afinidad por antitrombina III. Estos tetrasacáridos se simbolizan como sigue $\Delta\text{IIa-IIIa}_{\text{gal}}$ y $\Delta\text{IIa-IVs}_{\text{gal}}$ (S. YAMADA, K. YOSHIDA, M. SUGIURA, K.-H. KHOO, H. R. MORRIS, A. DELL, J. Biol. Chem. 270(7) 4780-4787 (1993))

30



El constituyente final de la mezcla degradada con heparinasas es el extremo de glicosenna Δ GlcA-Gal Gal Xyl-Ser (K. Sugahara et al J Biol Chem 270(39) 22914-22923 (1995) K Sugahara et al J Biol Chem 267(3) 1528-1533 (1992)) El ultimo está generalmente casi ausente en la enoxapanna sódica (véase RMN del Ejemplo 5)



En otro aspecto la invención proporciona un procedimiento cromatográfico para detectar grupos 1,6-anhidro. En una realización el método implica separar los diferentes oligosacáridos obtenidos después de la despolimerización y tratar de manera opcional con un agente reductor como NaBH_4 .

La separación de los diferentes oligosacáridos de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo mediante HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). En una realización el HPLC es una cromatografía de intercambio aniónico. En una realización relacionada la cromatografía de intercambio aniónico es una cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX).

Como se emplea en esta memoria el término cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX) implica una cromatografía de intercambio aniónico que se lleva

a cabo en cualquier resina que mantiene una carga positiva neta constante en el intervalo de aproximadamente pH 2-12. En determinadas realizaciones de la invención la cromatografía de intercambio aniónico fuerte utiliza un soporte sólido funcionalizado con grupos de intercambio de amonio cuaternario. Por ejemplo pueden
5 utilizarse columnas como Spherisorb® SAX (Waters Corp. Milford MA) que tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 5 µm, una longitud de columna de aproximadamente 25 cm y un diámetro de columna de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 4.6 mm.

El equipo utilizado puede ser cualquier cromatógrafo que permita la formación
10 de un gradiente de elución y que esté equipado con un detector de UV adecuado que sea adecuado para la detección selectiva de azúcares acetilados. En una realización de la invención el detector de UV es un diodo array que permite la generación de un espectro de UV de los constituyentes y que permite registrar las señales complejas que resultan de la diferencia entre la absorbancia a 2 longitudes de onda diferentes.
15 Dicho detector diodo array permite la detección específica de oligosacáridos acetilados. En una realización relacionada se utilizan fases móviles en el HPLC que son transparentes en la región UV hasta 200 nm. En esta realización se excluyen las fases móviles convencionales basadas en NaCl que tienen la desventaja adicional de requerir un cromatógrafo pasivado con el fin de resistir el poder corrosivo de los
20 cloruros. Las fases móviles que pueden utilizarse de acuerdo con esta realización de la invención incluyen, pero no están limitadas a, las fases móviles basadas en sales perclorato sódico, metanosulfonato o fosfato. En una realización la fase móvil es una disolución acuosa de metanosulfonato de amonio.

Por lo tanto, un objeto de la invención es también un método de análisis como
25 se ha definido más arriba mediante la separación por cromatografía de intercambio aniónico en la que se utiliza una fase móvil que es transparente en la región de UV de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 400 nm.

En determinadas realizaciones la separación mediante cromatografía aniónica fuerte se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 6.5. En
30 una realización relacionada se utilizará un pH en la región de aproximadamente 3. El pH puede controlarse, por ejemplo, mediante la adición de una sal a la fase móvil que posee un poder tamponador a pH = 3. En determinadas realizaciones de la invención se utiliza una sal como una sal fosfato que tienen una capacidad tamponadora a pH 3 mayor que la de los percloratos. Las condiciones ilustrativas para la separación
35 cromatográfica aparecen debajo.

Fase Móvil

Disolvente A NaH_2PO_4 2.5 mM que se lleva a pH 2.9 mediante la adición de H_3PO_4

Disolvente B NaClO_4 en 1N NaH_2PO_4 2.5 mM que se lleva a pH 3.0 mediante la adición de H_3PO_4

El gradiente de elución puede ser el siguiente

$T = 0 \text{ min } \%B = 3 \quad T = 40 \text{ min } \%B = 60 \quad T = 60 \text{ min } \%B = 80$

Se elige una temperatura adecuada por ejemplo de aproximadamente 40°C a aproximadamente 50°C y una velocidad de flujo de la bomba de acuerdo con la columna utilizada

Otros métodos para purificar muestras mediante cromatografía SAX son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo los métodos SAX están descritos por K. G. Rice y R. J. Linhardt Carbohydrate Research 190 219-233 (1989) A. Lamkjaer et al Carbohydrate Research 266 37-52 (1995) y en la patente internacional WO 90/01501 (Ejemplo 2). Los contenidos de estas referencias se incorporan en la presente memoria en su totalidad.

Otro aspecto de la invención es un método para detectar grupos específicos que se encuentran en las heparinas sin fraccionar o en las heparinas fraccionadas.

En una realización este método incrementa la especificidad de la detección UV de los grupos de la heparina o de LMWH. Como todos los polisacáridos no acetilados tienen a un pH determinado un espectro UV prácticamente similar es posible detectar de manera selectiva los azúcares acetilados si se toma como señal la diferencia entre la absorbancia a 2 longitudes de onda elegidas de manera tal que se anula la capacidad de absorción de los sacáridos no acetilados.

Como se ilustra más abajo a modo de ejemplo pueden elegirse 202 nm y 230 nm como longitudes de onda de detección y de referencia y se puede registrar la señal a 202-230 nm. Una persona experta en la técnica apreciará que la elección de la longitud de onda que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención dependerá del pH de la fase móvil (pueden ser necesarios ajustes de unos pocos nm para situarse en el pH óptimo).

Puede utilizarse en la invención cualquier detector de UV que pueda medir simultáneamente la absorbancia a dos o más longitudes de onda. En una realización de la invención se utiliza el detector DAD 1100 de la empresa Agilent Technologies. En esta realización se llevará a cabo una detección doble a 234 nm por una parte y a 202-230 nm por otra parte. El principio de la detección selectiva de oligosacáridos

acetilados está ilustrado en la Figura 1 en la que se compara el espectro UV de un disacárido sulfatado ΔIs con el de un disacárido acetilado ΔIa

Por lo tanto un objeto de la presente invención es también un método de análisis como se ha definido más arriba en el que el método de detección hace posible detectar de manera selectiva los azúcares acetilados

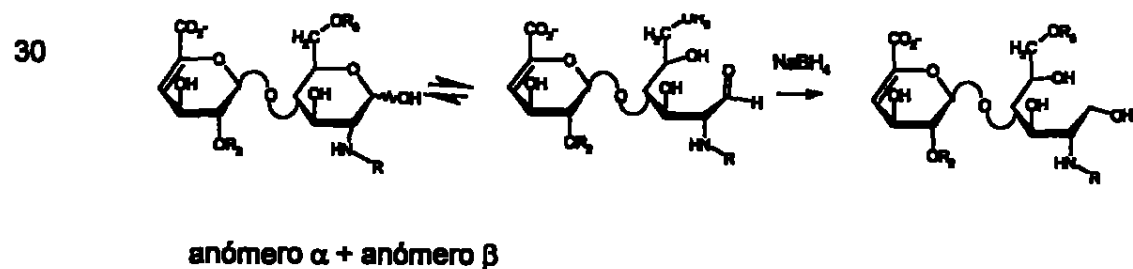
En determinadas realizaciones el método de análisis utiliza la separación mediante cromatografía SAX y los azúcares acetilados se detectan de manera selectiva midiendo la diferencia entre la absorbancia a dos longitudes de onda elegidas de manera que se anula la capacidad de absorción de los sacáridos no acetilados

La cuantificación de los cuatro restos 1-6-anhidro descritos más arriba requiere una selectividad suficiente del sistema cromatográfico respecto a todos los demás constituyentes de la mezcla. Sin embargo los dos disacáridos 1 y 2 que en general coeluyen no se resuelven bien respecto a ΔIa especialmente porque el último está presente en la forma de sus dos anómeros α y β

La identidad de los dos disacáridos 1 y 2 puede verificarse fácilmente ya que se forman en pocas horas a temperatura ambiente en una disolución acuosa de ΔIs que se lleva a pH 13 mediante la adición de NaOH. Sin embargo si se utiliza la detección doble los oligosacáridos acetilados ΔIVa , ΔIIa , $\Delta IIIa$, ΔIa , $\Delta Ia-IV_{glu}$ y $\Delta IIa-III_{glu}$ se identifican fácilmente

Las causas de la separación de los picos son las formas anoméricas por una parte y en menor medida la epimerización glucosamina $\leftrightarrow$ manosamina que está presente de manera parcial en ΔIs , $\Delta IIIs$ y ΔIs cuando éstos están en la posición terminal de la cadena de oligosacárido

En determinadas realizaciones de la invención los disacáridos 1 y 2 se cuantifican mediante la reducción de la muestra de la heparina de bajo peso molecular que se ha despolimerizado previamente con heparinasas por la acción de $NaBH_4$



Esta reducción tiene la ventaja de eliminar los anomersmos $\alpha \leftrightarrow \beta$ mediante la apertura del anillo del oligosacárido terminal. El cromatograma obtenido es más sencillo al haberse eliminado los anomersmos. Más aún, la reducción de $\Delta 1a$ reduce su retención en la columna y permite un ensayo sencillo de los disacáridos 1 y 2.

- 5 Los ejemplos de los cromatogramas descritos en las Figuras 2 y 3 ilustran claramente estos fenómenos y las ventajas de este método.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

- 10 La Figura 1 ilustra la detección selectiva de los oligosacáridos acetilados en la que se compara el espectro de UV de un disacárido sulfatado $\Delta 1a$ con el de un disacárido acetilado $\Delta 1a$ en la que el eje de las x representa la longitud de onda (nm) y el eje de las y representa la absorbancia (mAmp).

- 15 La Figura 2 muestra la separación cromatográfica de la enoxapanna despolimerizada con heparinasas antes y después de la reducción con NaBH_4 (señal en negro tenue UV a 234 nm, señal en negro grueso UV a 202-234 nm) en la que el eje de las x es el tiempo de elución (min) y el eje de las y representa la absorbancia (mAmp).

- 20 La Figura 3 muestra la separación cromatográfica de la heparina despolimerizada con heparinasas antes y después de la reducción con NaBH_4 (señal en negro tenue UV a 234 nm, señal en negro grueso UV a 202-234 nm) en la que el eje de las x es el tiempo de elución (min) y el eje de las y representa la absorbancia (mAmp).

EJEMPLOS

- 25 Los ejemplos que aparecen más abajo pretenden ilustrar las diferentes características de la invención. Una persona experta en la técnica apreciará que la invención no está limitada a las realizaciones ilustradas más abajo.

Ejemplo 1 Descripción General de la despolimerización Enzimática

Lo que sigue es una descripción general de la forma en la que se lleva a cabo la despolimerización enzimática y de cómo puede utilizarse en la presente invención.

- 30 La despolimerización enzimática se lleva a cabo durante 48 horas a temperatura ambiente mezclando 50 μl de una disolución que contiene 20 mg/ml de enoxapanna sódica que se va a ensayar, 200 μl de una disolución 100 mM ácido acético/NaOH a pH 7.0 que contiene 2 mM acetato cálcico y 1 mg/ml de BSA con 50 μl de la disolución madre de las 3 heparinasas. Las heparinasas se almacenan a -30°C . Las heparinasas están en una disolución tamponada y la titulación de cada heparinasa es 0.5 IU/ml (composición de la disolución tamponada: disolución acuosa de pH 7 de
- 35

KH_2PO_4 a una concentración de 0.01 mol/l y suplementada con albumina sérica bovina (BSA) a 2 mg/ml)

La reducción se lleva a cabo en 60 μl del producto despolimerizado con las heparinasas mediante la adición de 10 μl de una disolución 30 g/l de NaBH_4 en 100 mM acetato sódico preparada inmediatamente antes de ser utilizada

Ejemplo 2

RMN del Disacárido 3 obtenido de acuerdo con la descripción general del Ejemplo 1

Espectro de protones en D_2O 400 MHz T=298K, δ en ppm 3.34 (1H dd J=7 y 2Hz H2) 3.72 (1H t J=8Hz, H6) 3.90 (1H m H3) 4.03 (1H s H4) 4.20 (1H d J=8Hz H6) 4.23 (1H t J=5Hz H3) 4.58 (1H m H2) 4.78 (1H m H5) 5.50 (1H s H1) 5.60 (1H dd J=6 y 1Hz H1) 8.03 (1H d J=5Hz H4))

Ejemplo 3

RMN del Trisacárido 1 obtenido de acuerdo con la descripción general del Ejemplo 1

Espectro de protones en D_2O 400 MHz T=298K δ en ppm 3.15 (1H s H2) 3.25 (1H m H2) 3.60 (1H m H3) entre 3.70 y 4.70 (14H complejo sin resolver H3/H4/H6 H2/H3/H4/H5 H4/H5/H6 H2/H3) 4.75 (1H m H5) entre 5.20 y 5.40 (2H m H1 y H1) 5.45 (1H m H1) 5.56 (1H m H1) 5.94 (1H d J=5Hz, H4)

Ejemplo 4

RMN del Trisacárido 1 obtenido de acuerdo con la descripción general del Ejemplo 1

Espectro en D_2O 600 MHz (δ en ppm) 3.28 (1H m) 3.61 (1H t 7Hz) 3.79 (1H t 7Hz) 3.95 (1H d 6Hz) 4.00 (1H s) 4.20 (1H m) 4.28 (2H m) 4.32 (1H d 4Hz) 4.41 (1H s) 4.58 (1H s) 4.61 (1H s) 4.90 (1H s amplio) 5.24 (1H s) 5.45 (1H s) 5.95 (1H s)

Ejemplo 5

RMN de $\Delta\text{GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser}$ obtenido de acuerdo con la presente invención

Espectro en D_2O 500 MHz (δ en ppm) 3.30 (1H t 7Hz) 3.34 (1H t 8Hz) 3.55 (1H t 7Hz) 3.60 (1H t 7Hz) entre 3.63 y 3.85 (10H m), 3.91 (2H m) 3.96 (1H dd 7 y 2Hz) entre 4.02 y 4.10 (3H m) 4.12 (1H d 2Hz) 4.18 (1H m) 4.40 (1H d 6Hz) 4.46 (1H d 6Hz) 4.61 (1H d 6Hz) 5.29 (1H d 3Hz) 5.85 (1H d 3Hz)

Ejemplo 6 Principio de la Cuantificación

El contenido en 1,6-anhidro del cromatograma obtenido con la disolución

reducida se determina mediante el método de porcentaje del área normalizada

El coeficiente de capacidad de absorción molar de los ácidos urónicos se toma como constante y por consiguiente el factor de respuesta de un polisacárido es proporcional a su masa molecular

5 En los métodos de acuerdo con la invención se plantea la hipótesis ampliamente aceptada de que todos los oligosacáridos insaturados contenidos en la mezcla tienen la misma capacidad de absorción molar igual a $5\,500\text{ mol}^{-1}\text{ l cm}^{-1}$

Los dos restos 1,6-anhidro que coeluyen los disacáridos 1 y 2 se integran juntos

10 Por lo tanto es posible determinar el porcentaje en peso de todos los constituyentes de la mezcla despolimerizada de la heparina sin fraccionar o de la heparina fraccionada de partida por ejemplo los constituyentes como los derivados 1,6-anhidro o los derivados de azúcares acetilados. En el caso de los cuatro derivados 1,6-anhidro es decir disacárido 1, disacárido 2, disacárido 3 y tetrasacárido 1 que
15 corresponden a los picos 7, 8, 13 y 19

$$\% \text{ p/p}_{7+8} = 100 \frac{443 (\text{Area}_7 + \text{Area}_8)}{\sum \text{Mp}_x \text{Area}_x}$$

$$\% \text{ p/p}_{13} = 100 \frac{545 \text{Area}_{13}}{\sum \text{Mp}_x \text{Area}_x}$$

$$\% \text{ p/p}_{19} = 100 \frac{1210 \text{Area}_{19}}{\sum \text{Mp}_x \text{Area}_x}$$

se obtuvieron los porcentajes en peso siguientes

25 Area_7 , Area_8 , Area_{13} y Area_{19} corresponden a las áreas de cada uno de los picos 7, 8, 13 y 19. Las masas molares de cada uno de estos 4 compuestos son 443, 443, 545 y 1210 respectivamente. $\sum \text{Mp}_x \text{Area}_x$ corresponde a la proporción del área de cada pico del cromatograma respecto a la masa molar del producto correspondiente

30 Si M_p es la masa media de la heparina de bajo peso molecular estudiada, el porcentaje de las cadenas de oligosacárido que terminan con un anillo 1,6-anhidro se obtiene de la manera siguiente

$$\%_{1,6\text{anhidro}} = M_p \left(\frac{\% \text{ p/p}_{7+8}}{443} + \frac{\% \text{ p/p}_{13}}{545} + \frac{\% \text{ p/p}_{19}}{1210} \right)$$

De manera similar puede determinarse el porcentaje en peso de otros componentes de una muestra de material elegido de hepannas sin fraccionar y hepannas fraccionadas

La masa molecular exacta se atribuye a todos los picos identificados de los cromatogramas (véase la Tabla 1)

Tabla 1

Oligosacárido	Oligosacárido después de la reducción	Masa molecular
1	1	741
2	20	401
3	3	734
4	21	481
5	22	481
6	23	503
7	7	443
8	8	443
9	24	503
10	25	563
11	26	563
12	27	563
13	13	545
14	28	605
15	29	1 066
16	30	665
17	31	965
18	32	1 168
19	19	1 210

Lo que sigue es la nomenclatura de los sacándos que se corresponden con los números de los picos de las Figuras 2 y 3

- 10
- 1 $\Delta\text{GlcA}\beta_{1-3}\text{Gal}\beta_{1-3}\text{Gal}\beta_{1-4}\text{Xyl}\beta_1\text{-O-Ser}$
 - 2 sal sódica del ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-acetamido- α -D-glucopiranosil
 - 3 $\Delta\text{GlcA}\beta_{1-3}\text{Gal}\beta_{1-3}\text{Gal}\beta_{1-4}\text{Xyl}\beta_1\text{-O-CH}_2\text{-COOH}$
 - 4 sal disódica del ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-4-enegalactopiranosilurónico-

- (1→4) 2-deoxi 2-sulfamido β-D-glucopiranososa
- 5 sal sódica del ácido 4-deoxi-α-L treo-hex-enepiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-sulfamido-α-D-glucopiranosil
- 6 sal disódica del ácido 4-deoxi-α-L treo-hex-enepiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-acetamido-6-O-sulfo-α D-glucopiranosil
- 5 7 sal disódica del ácido 4-deoxi-α-L-treo-hex-4-enepiranosilurónico-(1→4)-1 6-anhidro-2-deoxi-2-sulfamido-β-D-glucopiranososa (disacádo 1)
- 8 sal disódica del ácido 4-deoxi-α L treo-hex-4-enepiranosilurónico-(1→4) 1 6-anhidro-2-deoxi-2-sulfamido-β-D-manopiranososa (disacádo 2)
- 10 9 sal disódica del ácido 4-deoxi 2 O-sulfo-α-L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1→4) 2-deoxi-2-acetamido-α D-glucopiranosil
- 10 sal trisódica del ácido 4-deoxi-α-L-treo-hex-4-enegalactopiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo-β-D-glucopiranososa
- 11 sal trisódica del ácido 4-deoxi-α L-treo-hex-enepiranosilurónico (1→4) 2-deoxi 2-sulfamido-6-O-sulfo-β-D-glucopiranosil
- 15 12 sal trisódica del ácido 4-deoxi-2 O-sulfo-α-L treo-hex-enepiranosilurónico-(1→4) 2-deoxi 2-sulfamido-α-D-glucopiranosil
- 13 sal trisódica del ácido 4-deoxi 2 O-sulfo-α-L-treo-hex-4-enepiranosilurónico (1→4) 1 6-anhidro-2-deoxi 2-sulfamido-β-D-glucopiranososa (Disacádo 3)
- 20 14 sal trisódica del ácido 4-2-deoxi 2-O-sulfo-α-L-treo-hex-enepiranosilurónico (1→4) 2-deoxi 2-acetamido-6-O-sulfo-α D-glucopiranosil
- 15 sal pentasódica del ácido 4-deoxi-α-L treo-hex-enepiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-acetamido-6-O-sulfo-α D-glucopiranosil (1→4)-β-ácido D-glucopiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-sulfamido-3-O-sulfo-α-D-glucopiranosil)
- 25 16 sal tetrasódica del ácido 4-2 O-sulfo-α-L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo-α D-glucopiranosil
- 17 sal hexasódica del ácido 4-deoxi-α-L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-acetamido-6-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)-ácido β-D-glucopiranosilurónico (1→4) 2-deoxi-2-sulfamido-3 6-di-O-sulfo-α D-glucopiranosil)
- 30 18 sal hexasódica del ácido 4-deoxi 2-O-sulfo-α L treo-hex-enepiranosilurónico-(1→4) 2-deoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo-D-glucopiranosil-(1→4) 2-O-sulfo-ácido α-L-idopiranosilurónico

- 19 sal hexasódica del ácido 4-deoxi 2 O-sulfo- α -L treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi 2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4) 2-O-sulfo-ácido α -L-idopiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-1 6-anhidro-2-deoxi-sulfamido- β -D-manopiranosose (tetrasacando 1)
- 5 20 sal sódica del ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4) 2-deoxi-2-acetamido- α D-glucitol
- 21 sal disódica del ácido 4-deoxi- α L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi 2-sulfamido- β -D-glucitol
- 22 sal disódica del ácido 4-deoxi- α -L treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi-2-sulfamido- α D-glucitol
- 10 23 sal disódica del ácido 4-deoxi- α L-treo-hex-enepiranosilurónico (1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi 2 acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol
- 24 sal disódica del ácido 4-deoxi 2 O-sulfo- α -L treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi-2-acetamido- α D-glucitol
- 15 25 sal trisódica del ácido 4-deoxi- α L-treo-hex-eneagalactopiranosilurónico (1 $\rightarrow$ 4) 2-deoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- β -D-glucitol
- 26 sal trisódica del ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol
- 27 sal trisódica del ácido 4-deoxi 2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi 2-sulfamido- α -D-glucitol
- 20 28 sal trisódica del ácido 4-deoxi 2 O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi 2 acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol
- 29 sal pentasódica del ácido 4-deoxi- α L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi-2 acetamido-6-O-sulfo- α D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 4)-ácido β -D-glucopiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4) 2-deoxi-2-sulfamido-3-O-sulfo- α -D-glucitol)
- 25 30 sal trisódica del ácido 4-2-deoxi-2-O-sulfo- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi 2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol
- 31 sal hexasódica del ácido 4-deoxi- α -L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-ácido β -D-glucopiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4) 2-deoxi-2-sulfamido-3 6-di-O-sulfo- α -D-glucitol)
- 30 32 sal hexasódica del ácido 4-deoxi-2-O-sulfo- α L-treo-hex-enepiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4) 2-deoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo-D-glucopiranosil- α (1 $\rightarrow$ 4)-2-O-sulfo-ácido α -L-idopiranosilurónico (forma reducida con NaBH₄)

4A

Abreviaturas Utilizadas.

- IdoA ácido α L Idopiranosilurónico
- GlcA ácido β -D-Glucopiranosilurónico
- Δ GlcA ácido 4 5-insaturado ácido 4-deoxi- α L *treo*-hex-enepiranosilurónico
- 5 Gal D-Galactosa
- Xyl xilosa
- GlcNAc 2-deoxi-2 acetamido- α D-glucopiranososa
- GlcNS 2-deoxi 2-sulfamido- α D-glucopiranososa
- 2S 2-O-sulfato
- 10 3S 3-O-sulfato
- 6S 6-O-sulfato

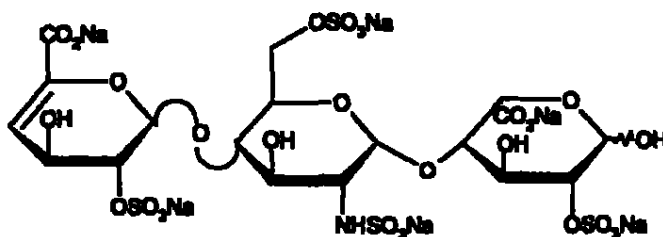
La presente invención puede englobarse en otras formas específicas sin alejarse de su espíritu o de sus atributos esenciales

REIVINDICACIONES

- | | |
|----|--|
| 1 | Un método para cuantificar la cantidad de componentes de una muestra de un material seleccionado de heparinas sin fraccionar y de heparinas fraccionadas que comprende |
| 5 | (a) despolimerizar la muestra mencionada mediante un método enzimático y |
| | (b) detectar la cantidad de los componentes de la muestra despolimerizada de la etapa (a) mediante cromatografía líquida de alta resolución |
| 2 | El método según la reivindicación 1 en el que el método enzimático se lleva a |
| 10 | cabo utilizando al menos una heparinasa |
| 3 | El método según la reivindicación 1 en el que el método enzimático se lleva a |
| | cabo utilizando una mezcla de heparinasa 1 (EC 4.2.2.7) heparinasa 2 (heparinasa II) y heparinasa 3 (EC 4.2.2.8) |
| 4 | El método según la reivindicación 1 en el que la heparina fraccionada es |
| 15 | enoxaparina sódica |
| 5 | El método según la reivindicación 1 en el que la cromatografía líquida de alta |
| | resolución utilizada en la etapa (b) es cromatografía de intercambio aniónico |
| 6 | El método según la reivindicación 1 en el que la cromatografía líquida de alta |
| | resolución utilizada en la etapa (b) es cromatografía de intercambio aniónico |
| 20 | fuerte (SAX) |
| 7 | El método según la reivindicación 6 en el que la cromatografía de intercambio |
| | aniónico fuerte se lleva a cabo utilizando una columna Sphensorb® SAX |
| 8 | El método definido en la reivindicación 1 en el que la cromatografía líquida de |
| | alta resolución se lleva a cabo en una fase móvil que es transparente a la luz |
| 25 | UV con longitudes de onda de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 400 nm |
| 9 | El método según la reivindicación 1 en el que la cromatografía líquida de alta |
| | resolución se lleva a cabo en una fase móvil que comprende al menos una sal |
| | elegida de perclorato sódico sales metanosulfonato y sales fosfato |
| 30 | 10 El método según la reivindicación 1 en el que la cromatografía líquida de alta |
| | resolución se lleva a cabo en una fase móvil que comprende sales de |
| | perclorato sódico |
| | 11 El método según la reivindicación 6 en el que la cromatografía de intercambio |
| | aniónico fuerte se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 2.0 a |
| 35 | aproximadamente 6.5 |

- 12 El método según la reivindicación 6 en el que la cromatografía de intercambio aniónico fuerte se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 3
- 13 El método según la reivindicación 1 en el que la fase móvil comprende una disolución de perclorato sódico que se mantiene a un pH de aproximadamente 3
- 5 0
- 14 El método según la reivindicación 1 en el que la muestra despolimerizada comprende al menos una cadena de oligosacárido seleccionada de una cualquiera de las siguientes

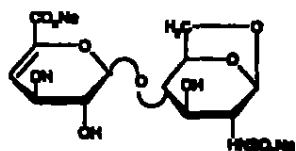
10



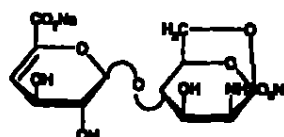
15

trisacárido 1

20

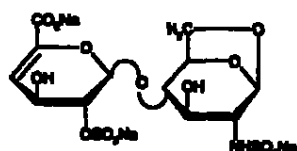


disacárido 1

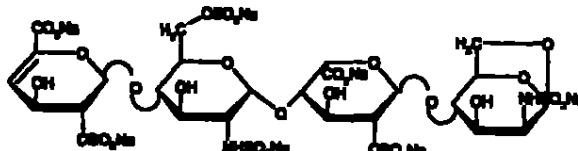


disacárido 2

25

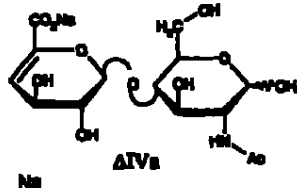


disacárido 3

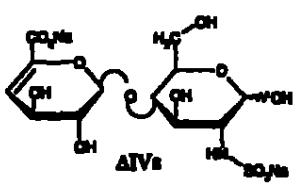


tetrasacárido 1

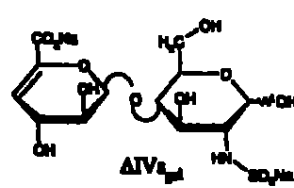
30



Na

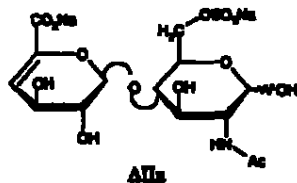


ΔIVa

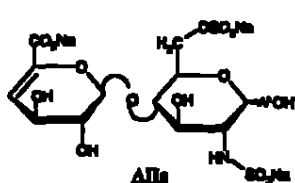


ΔIVa

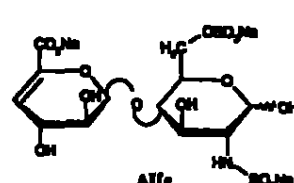
35



ΔIIa

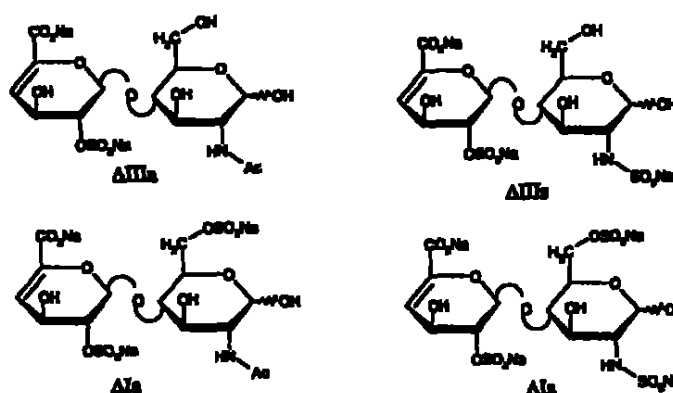


ΔIIa

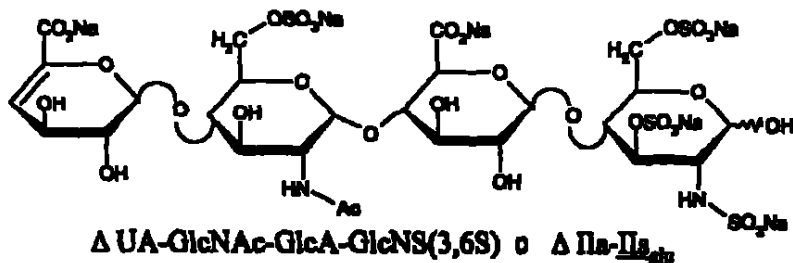


ΔIIa

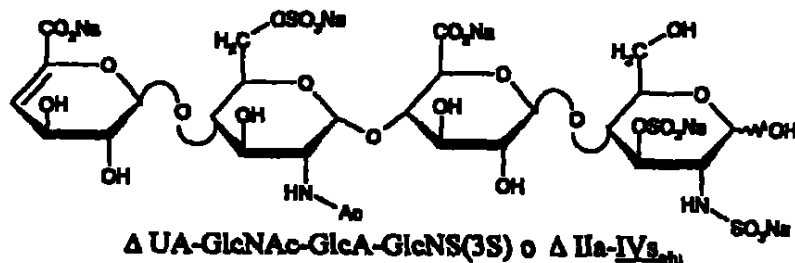
5



10



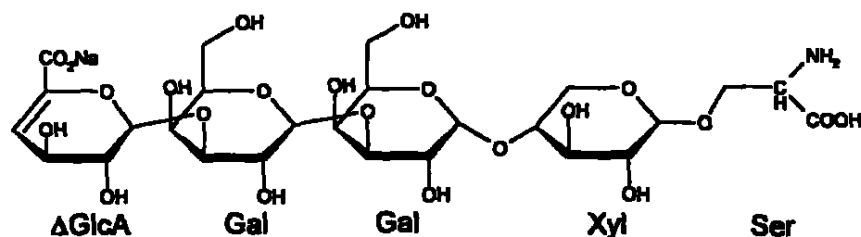
15



20

y

25



30

15

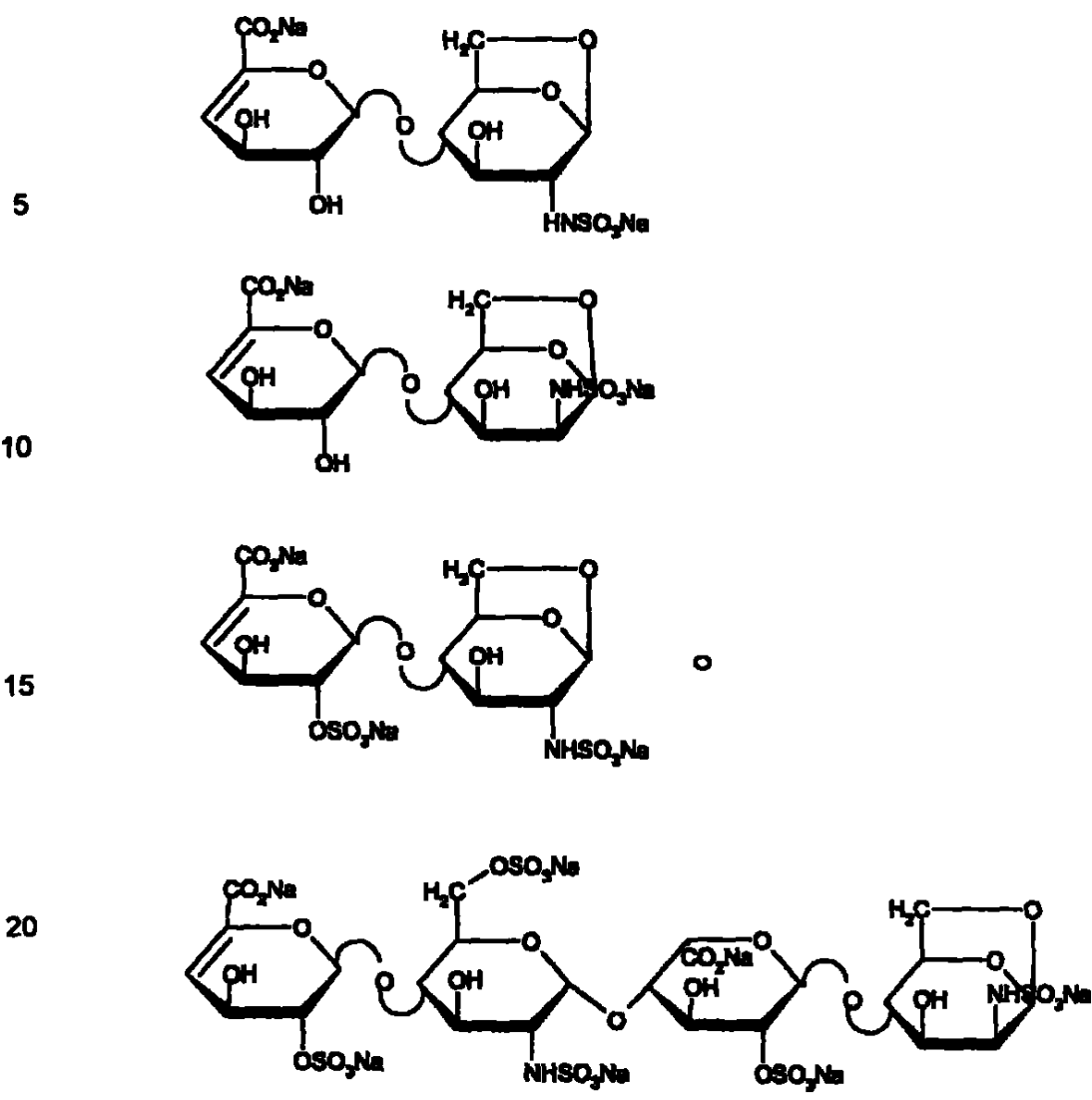
El método según la reivindicación 1 en el que la muestra despolimerizada comprende al menos una cadena de oligosacárido cuyo extremo está modificado con un enlace 1 6-anhidro

16

El método según la reivindicación 15 en el que la al menos una cadena de oligosacárido se elige de cualquiera de las siguientes

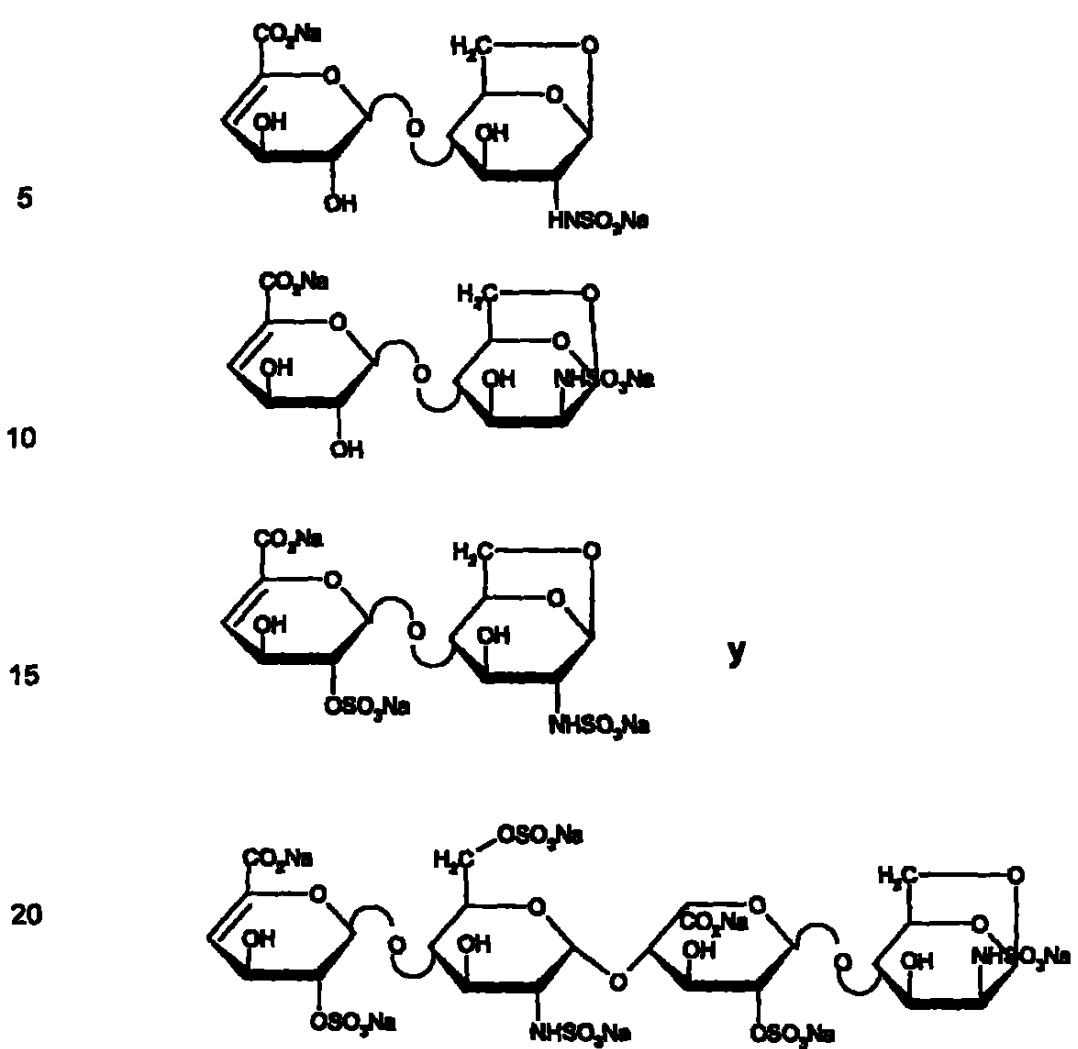
35

51



25

17 El método según la reivindicación 4 en el que la muestra despolimerizada comprende al menos un resto 1,6-anhidro elegido de cualquiera de los siguientes



- 18 El método según la reivindicación 17 en el que el al menos un resto 1,6-anhidro varía entre 15% a 25% del peso molecular promedio en peso de la muestra
- 19 El método según la reivindicación 1 en el que los componentes detectados en la muestra despolimerizada de la etapa (b) son azúcares acetilados
- 20 El método según la reivindicación 19 en el que los azúcares acetilados se detectan de manera selectiva restando una absorbancia medida a una longitud de onda a la que absorben tanto los azúcares acetilados como los no acetilados de una absorbancia medida a una longitud de onda a la que absorben los azúcares acetilados pero no los no acetilados

52
83

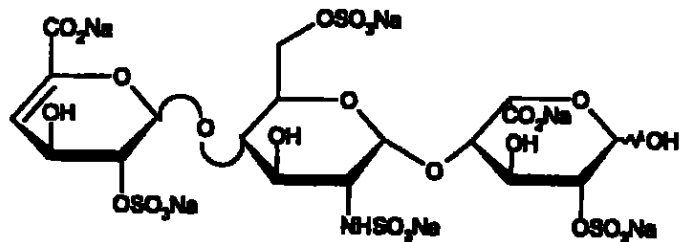
- 21 El método según la reivindicación 19 en el que los azúcares acetilados detectados se seleccionan de los oligosacáridos acetilados ΔIVa ΔIIa $\Delta IIIa$ ΔIa ΔIIa IVs_{glu} y ΔIIa IIs_{glu}
- 22 Un método para cuantificar la cantidad de restos 1 6-anhidro de una muestra de enoxaparina sódica que comprende
- 5 (a) despolimerizar la muestra mencionada utilizando una mezcla de heparinasa 1 (EC 4 2 2 7) heparinasa 2 (heparina liasa II) y heparinasa 3 (EC 4 2 2 8) y
- (b) detectar la cantidad de los restos 1 6-anhidro de la muestra despolimerizada de la etapa (a) mediante cromatografía líquida de alta resolución
- 10 23 Un método según la reivindicación 22 en el que la cantidad de los restos 1 6-anhidro varía entre 15% a 25% del peso molecular medio de los oligosacáridos de la muestra
- 15 24 Un método para cuantificar la cantidad de componentes de una muestra de un material elegido de heparinas sin fraccionar y de heparinas fraccionadas que comprende
- (a) despolimerizar la muestra mencionada mediante un método enzimático
- y
- 20 (b) reducir la muestra despolimerizada de la etapa (a)
- (c) detectar la cantidad de los componentes de la muestra reducida de (b) mediante cromatografía líquida de alta resolución
- 25 El método según la reivindicación 24 en el que el método enzimático se lleva a cabo utilizando al menos una heparinasa
- 25 26 El método según la reivindicación 24 en el que el método enzimático se lleva a cabo utilizando una mezcla de heparinasa 1 (EC 4 2 2 7) heparinasa 2 (heparina liasa II) y heparinasa 3 (EC 4 2 2 8)
- 27 El método según la reivindicación 24 en el que la reducción de la muestra despolimerizada de la etapa (a) se lleva a cabo mediante la exposición a un agente reductor
- 30 28 El método según la reivindicación 27 en el que el agente reductor es $NaBH_4$ o una sal de un metal alcalino del anión borohidruro
- 29 El método según la reivindicación 24 en el que la heparina fraccionada es enoxaparina sódica
- 35 30 El método según la reivindicación 27 en el que la reducción reduce los

13
SA

extremos reductores de la enoxapanna sódica que no están en la forma 1 6-anhidro

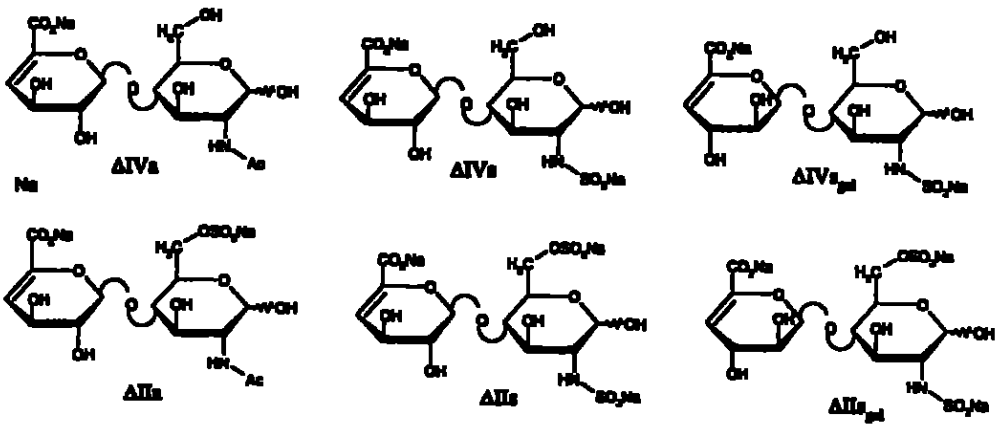
- 31 El método según la reivindicación 24 en el que la cromatografía líquida de alta resolución utilizada en la etapa (c) es cromatografía de intercambio aniónico
- 5 32 El método según la reivindicación 24 en el que la cromatografía líquida de alta resolución utilizada en la etapa (c) es cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX)
- 33 El método según la reivindicación 32 en el que la cromatografía de intercambio aniónico fuerte se lleva a cabo utilizando una columna Sphensorb® SAX
- 10 34 El método definido en la reivindicación 24 en el que la cromatografía líquida de alta resolución se lleva a cabo en una fase móvil que es transparente a la luz UV con longitudes de onda de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 400 nm
- 35 El método según la reivindicación 24 en el que la cromatografía líquida de alta resolución se lleva a cabo en una fase móvil que comprende al menos una sal elegida de perclorato sódico sales metanosulfonato y sales fosfato
- 15 36 El método según la reivindicación 24 en el que la cromatografía líquida de alta resolución se lleva a cabo en una fase móvil que comprende sales perclorato sódico
- 20 37 El método según la reivindicación 32 en el que la cromatografía de intercambio aniónico fuerte se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 2 0 a aproximadamente 6 5
- 38 El método según la reivindicación 32 en el que la cromatografía de intercambio aniónico fuerte se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 3
- 25 39 El método según la reivindicación 24 en el que la cromatografía líquida de alta resolución utiliza una fase móvil que comprende una disolución de perclorato sódico que se mantiene a un pH de aproximadamente 3 0
- 40 El método según la reivindicación 28 en el que la muestra despolimerizada comprende al menos una cadena de oligosacárido seleccionada de cualquiera
- 30 de las siguientes

5



trisacárido 1

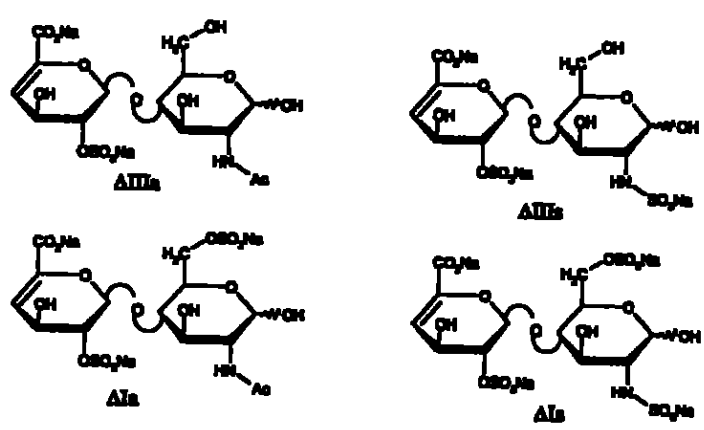
10



15

20

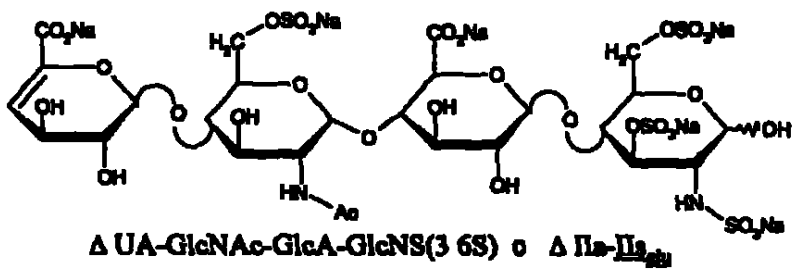
25



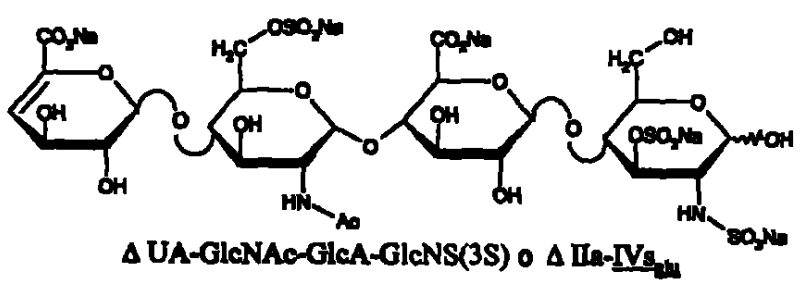
30

SS
36

5

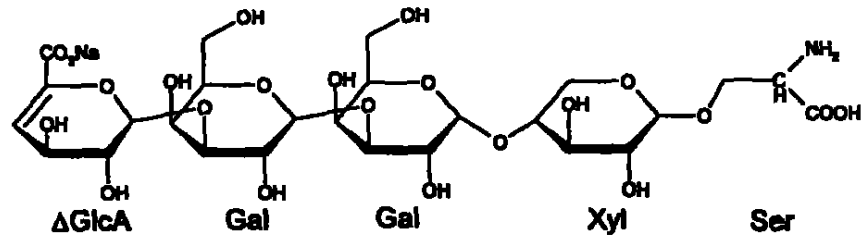


10



y

15



20

en el que la cadena de oligosacárido está en su forma reducida

41

El método según la reivindicación 24 en el que la muestra despolimerizada comprende al menos una cadena de oligosacárido cuyo extremo está modificado con un enlace 1 6-anhidro

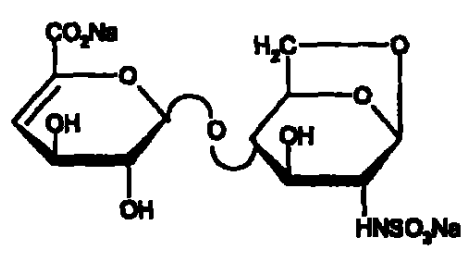
42

El método según la reivindicación 41 en el que la al menos una cadena de oligosacárido se elige de cualquiera de las siguientes

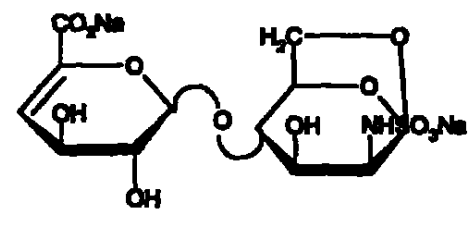
25

87
87

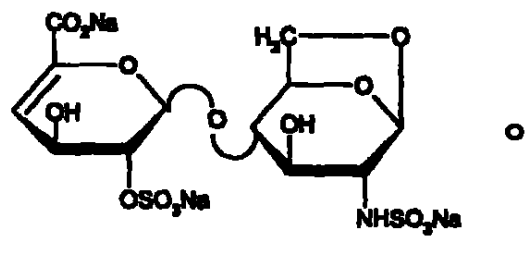
5



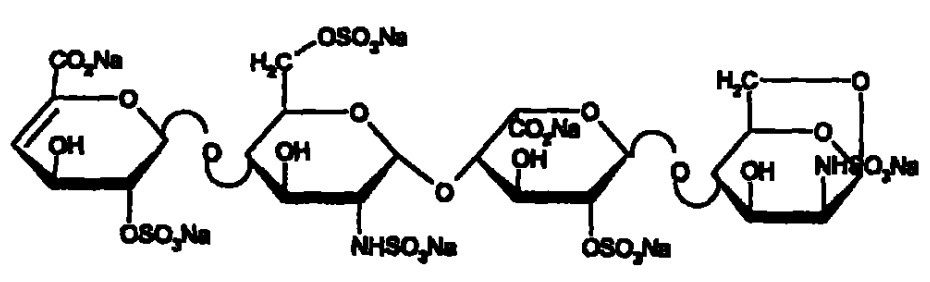
10



15

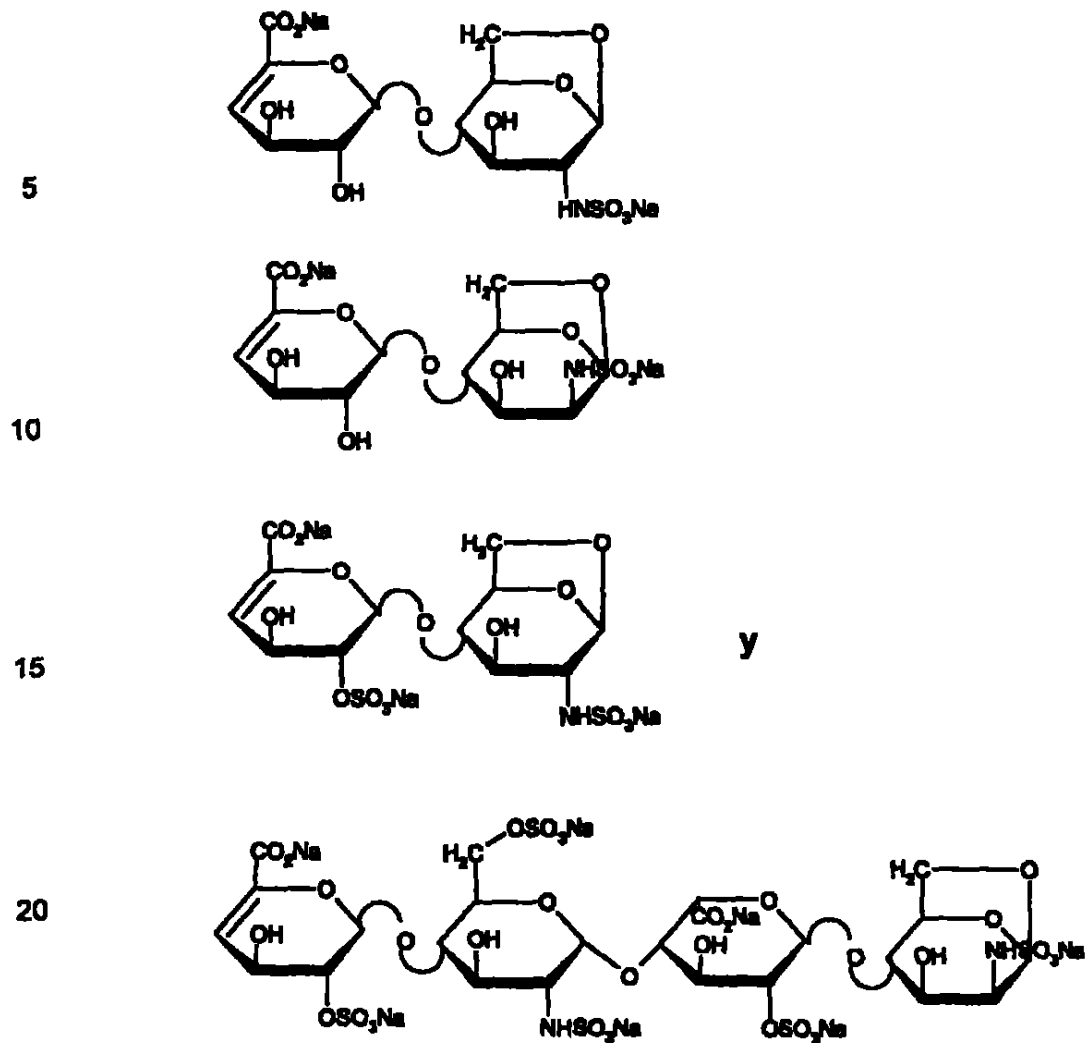


20



25

43 El método según la reivindicación 29 en el que la muestra despolimerizada comprende una mezcla de restos 1 6-anhidro que comprende



- 25 44 El método según la reivindicación 43 en el que la mezcla de restos 1,6-anhidro
varía entre 15% a 25% del peso molecular promedio en peso de la muestra
- 45 El método según la reivindicación 24 en el que los componentes detectados en
la muestra despolimerizada de la etapa (b) son azúcares acetilados
- 46 El método según la reivindicación 45 en el que los azúcares se detectan de
30 manera selectiva restando una absorbancia medida a una longitud de onda a la
que absorben tanto los azúcares acetilados como los no acetilados de una
absorbancia medida a una longitud de onda a la que absorben los azúcares
acetilados pero no los no acetilados
- 47 El método según la reivindicación 45 en el que los azúcares acetilados
35 detectados se seleccionan de los oligosacáridos acetilados ΔIVa ΔIIa ΔIIIa

ΔIa ΔIIa -IVs_{gr} y ΔIa IIIs_{gr}

- 48 Un método para cuantificar la cantidad de restos 1 6-anhidro de una muestra de enoxaparina sódica que comprende
- 5 (a) despolimerizar la muestra mencionada utilizando una mezcla de heparinasa 1 (EC 4 2 2 7) heparinasa 2 (heparinasa II) y heparinasa 3 (EC 4 2 2 8)
- (b) reducir la muestra despolimerizada de la etapa (a) y
- (c) detectar la cantidad de restos 1 6-anhidro en la muestra reducida de la etapa (b) mediante cromatografía líquida de alta resolución
- 10 49 Un método según la reivindicación 48 en el que la cantidad de restos 1 6-anhidro varía entre 15% a 25% del peso molecular promedio en peso de la muestra

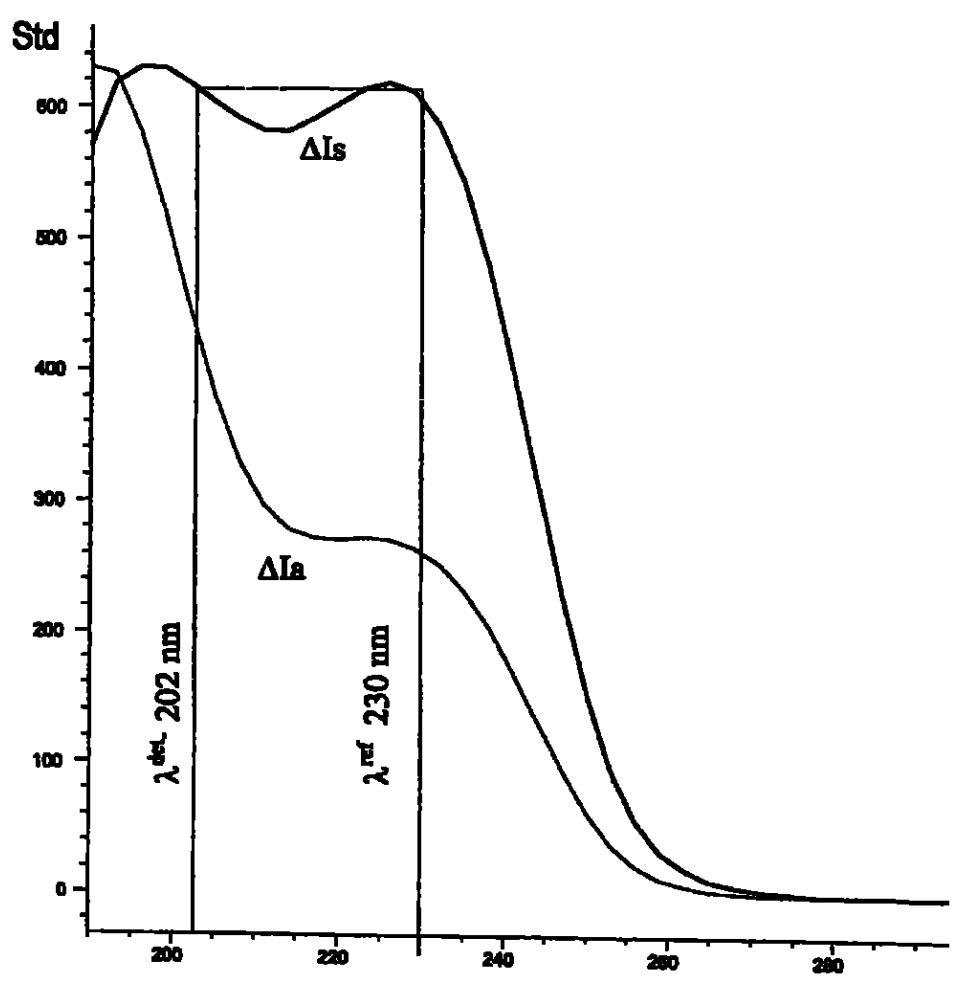


Figure 1

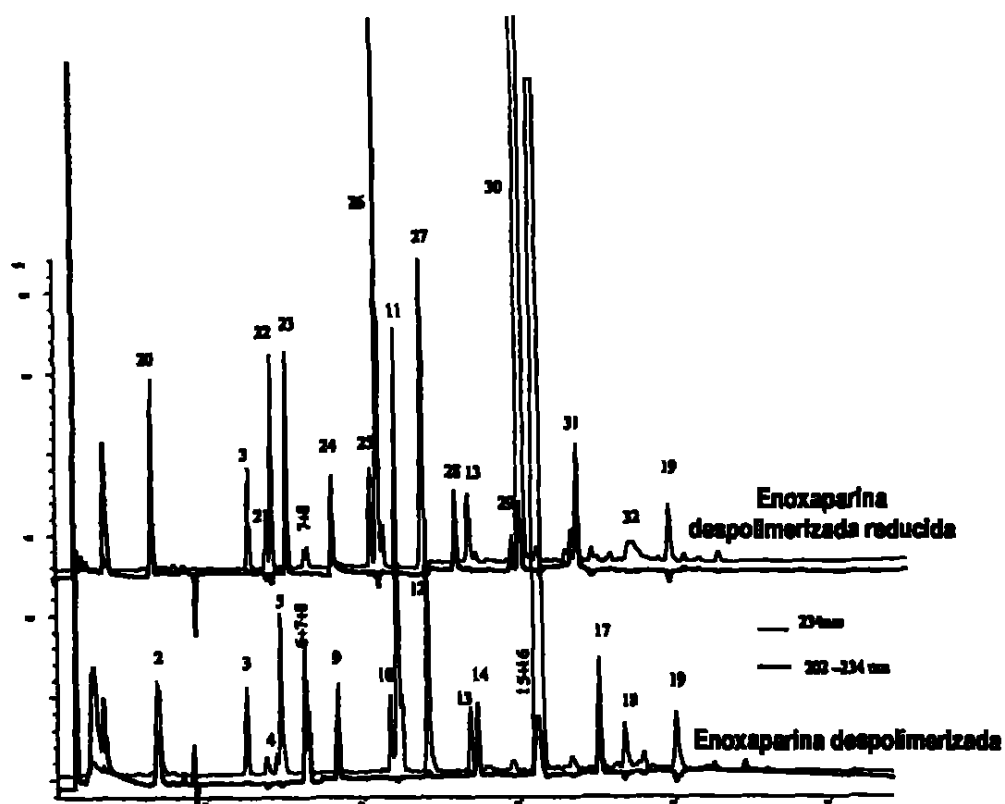


Figura 2

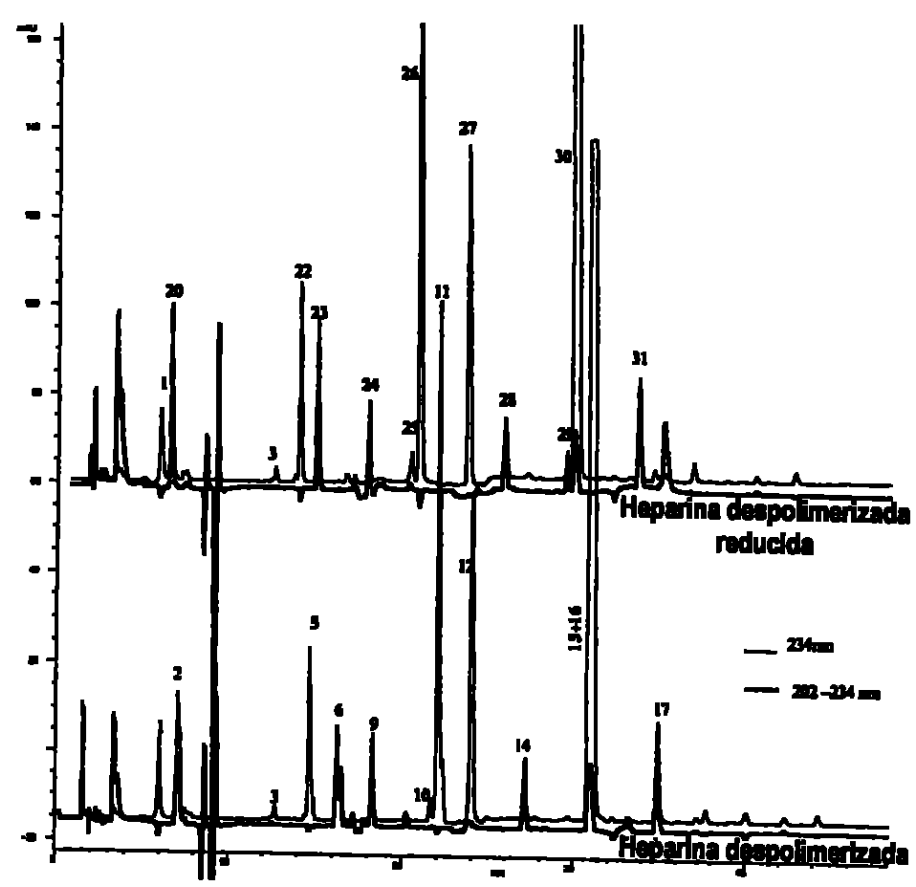


Figura 3

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference FRAV2004-005	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as where applicable Item 5 below	
International application No PCT/EP2005/003720	International filing date (day/month/year) 22/03/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 24/03/2004
Applicant AVENTIS PHARMA S A		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau

This International Search Report consists of a total of 4 sheets



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1 Basis of the report

- a With regard to the language the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed unless otherwise indicated under this item



The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b))

- b ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application see Box No I

- 2 ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II)

- 3 ☐ Unity of invention is lacking (see Box III)

4 With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows

METHOD FOR QUANTITATIVELY DETERMINING SPECIFIC CONSTITUTING HEPARINS OR LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARINS USING HPLC

5 With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established according to Rule 38.2(b) by this Authority as it appears in Box No IV. The applicant may within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6 With regard to the drawings

- a the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No 1



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority because the applicant failed to suggest a figure



as selected by this Authority because this figure better characterizes the invention

- b ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/00372063
64A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/33468 A (LARNKJAER ANNI , OESTERGAARD PER BJOERN (DK)) 14 December 1995 (1995-12-14) page 5, lines 12-16, examples 1,2	1-49
X	THANAWIROON CHARUWAN ET AL "Liquid chromatography/mass spectrometry sequencing approach for highly sulfated heparin-derived oligosaccharides " 23 January 2004 (2004-01-23), JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL 279, NR 4, PAGE(S) 2608-2615 , XP002297923 ISSN 0021-9258 the whole document	1,22,24, 48
	— — — — — -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents

- A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- E⁺ earlier document but published on or after the international filing date
- L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- O⁺ document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- P⁺ document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- T⁺ later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- Y⁺ document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 June 2005

Date of mailing of the international search report

20/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office P.B. 5018 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Komenda, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/003720b4
65

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IMANARI T ET AL "High-performance liquid chromatographic analysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol 720 no 1, 12 January 1996 (1996-01-12), pages 275-293, XP004038365 ISSN 0021-9673 page 283 - page 286	1 22,24 48
X	VYNIOS D H ET AL "Advances in analysis of glycosaminoglycans its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol 781, no 1-2, 5 December 2002 (2002-12-05), pages 21-38, XP004394146 ISSN 1570-0232 the whole document	1,22,24, 48
X	THANAWIROON C ET AL "Separation of a complex mixture of heparin-derived oligosaccharides using reversed-phase high-performance liquid chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol 1014, no 1-2, 3 October 2003 (2003-10-03), pages 215-223, XP004456355 ISSN 0021-9673 the whole document	1,22,24, 48
A	WO 01/29055 A (AVENTIS PHARMA SA) 26 April 2001 (2001-04-26) cited in the application example A	22

Form PCT/ISA/E10 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/003720

65
66

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9533468	A	14-12-1995	AU 2560995 A WO 9533468 A1	04-01-1996 14-12-1995
WO 0129055	A	26-04-2001	FR 2800074 A1 AU 781414 B2 AU 7930200 A BR 0014939 A CA 2388369 A1 CN 1379781 A CZ 20021385 A3 EA 4046 B1 EE 200200208 A EP 1226148 A2 WO 0129055 A2 HR 20020330 A2 HU 0203821 A2 JP 2003512385 T MX PA02003945 A NO 20021859 A NZ 518539 A PL 363052 A1 SK 5272002 A3 TR 200201102 T2 US 6617316 B1 ZA 200203102 A	27-04-2001 19-05-2005 30-04-2001 18-06-2002 26-04-2001 13-11-2002 17-07-2002 25-12-2003 16-06-2003 31-07-2002 26-04-2001 30-04-2004 28-04-2003 02-04-2003 23-10-2002 13-06-2002 29-10-2004 15-11-2004 06-08-2002 23-12-2002 09-09-2003 18-07-2003

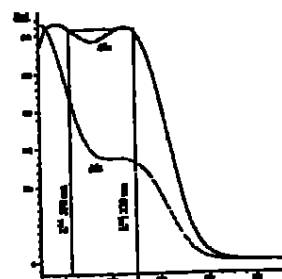
66

PC Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		67
(21) N de solicitud 06095229		(51) Int Cl C08B 037/000		
22) Fecha de solicitud 21/09/2006		(71) Solicitante(s) AVENTIS PHARMA S.A.		
(30) Prioridad	(31) 04280780 7	24/03/04	EP	
		(72) Inventor(es) PIERRE MOURIER CHRISTIAN VISKOV		
		(74) Apoderado: EMILIO FERRERO		
(85)	Fecha limite inicio fase nacional 24/10/2006		(87) Publicación Internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha. 29/09/2005	
	Fecha de presentación de la solicitud 22/03/2005		N publicación WO 2005/090409 A1	
	No de solicitud PCT/EP2005/003720			
(54) Título MÉTODO PARA DETERMINAR CUANTITATIVAMENTE LOS ESPECÍFICOS QUE CONSTITUYEN HEPARINAS O LAS HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR USANDO HPLC				

Reivindicación(es)

- Un método para cuantificar la cantidad de componentes de una muestra de un material seleccionado de heparinas sin fraccionar y de heparinas fraccionadas, que comprende
(a) despolimerizar la muestra mencionada mediante un método enzimático y
(b) detectar la cantidad de los componentes de la muestra despolimerizada de la etapa (a) mediante cromatografía líquida de alta resolución
- El método según la reivindicación 1 en el que el método enzimático se lleva a cabo utilizando al menos una heparinasa
- El método según la reivindicación 1 en el que el método enzimático se lleva a cabo utilizando una mezcla de heparinasa 1 (EC 4.2.2.7) heparinasa 2 (heparina liasa II) y heparinasa 3 (EC 4.2.2.8)
- El método según la reivindicación 1 en el que la heparina fraccionada es enoxaparina sódica.
- El método según la reivindicación 1 en el que la cromatografía líquida de alta resolución utilizada en la etapa (b) es cromatografía de intercambio aniónico

- El método según la reivindicación 1 en el que la cromatografía líquida de alta resolución utilizada en la etapa (b) es cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX)
- El método según la reivindicación 8, en el que la cromatografía de intercambio aniónico fuerte es llevada a cabo utilizando una columna Spherisorb SAX.
- El método definido en la reivindicación 1 en el que la cromatografía líquida de alta resolución se lleva a cabo en una fase móvil que es transparente a la luz UV con longitudes de onda de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 400 nm





FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S.A.
Desarrollo de Software y Servicios

68

Expediente No		No de unidades	No de Follo
Item			
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO	1	✓
10	OTROS:		
Observaciones: Costo Faltante			

67
69

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-095229-00000-0000
Fec 2006-09-21 17:30:46 Dep 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEMII
Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 88

RECIBO OFICIAL DE CAJA 06 71,893
FECHA SEPTIEMBRE 19 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	Vr PAGO
CAVELER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050 001 0-6	48872310	18/09 2006	49,351,180 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-0	SOLICITUDES	
		1. TRANSFER DE SOL DE PATENTE DE IN	463,000 00
		TOTAL :	463,000

SON CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

810 12457-891008-4

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACIÓN DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (/) MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(/)	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	(/)	()
-Descripción de la invención	(/)	()
Dibujos de ser estos pertinentes.	(/)	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas	(/)	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica del Esquema Trazado	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable


21 de Sep 2006

Fecha

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
AVENTIS PHARMA S A

REFERENCIA	Radicación No	06 95229
	Solicitud internacional	PCT/EP2005/003720
	Fecha inicio fase nacional	24/10/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No	1482

Como resultado del examen de forma realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT) regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio se le comunica que

1 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486 se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio complete los requisitos anteriormente enunciados En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5 2 literal e) del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No 10 de 2001

ALIX CARMENZA RESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 02 FEB 2007
lerazo

20

20