

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE GLICOSAMINOGLICANOS, HEPARINAS Y SUS DERIVADOS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Campo de la invención

5

La presente invención describe un procedimiento de análisis por resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^1H - ^{13}C HSQC) de glicosaminoglicanos en general, y de heparinas y heparinas de bajo peso molecular y sus derivados en particular, que permite su análisis cuantitativo.

10

Antecedentes de la invención

15

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las más importantes y extendidas técnicas analíticas utilizadas en la caracterización de glicosaminoglicanos en general y heparinas y heparinas de bajo peso molecular y sus derivados en particular.

20

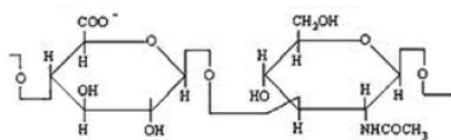
La posibilidad de realizar tanto experimentos monodimensionales como bidimensionales hace a esta técnica altamente sensible para determinar pequeñas variaciones de la estructura molecular, haciéndola por tanto muy ventajosa para una adecuada caracterización de estos compuestos.

25

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos lineales y cargados negativamente con un peso molecular medio entre 10 – 100 KDa (The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. Gandhi NS y Mancera RL. Chem Biol Drug Des 2008; 72:455-482). Hay dos grandes grupos de glicosaminoglicanos: los no sulfatados (como ácido hialurónico) y los sulfatados (como condroitín sulfato, dermatán sulfato, keratán sulfato, heparina y heparán sulfato). Las cadenas de glicosaminoglicanos están formadas por unidades disacarídicas o disacáridos compuestos por un ácido urónico (ácido D-glucurónico o L-idurónico) y un amino azúcar (D-galactosamina o D-glucosamina).

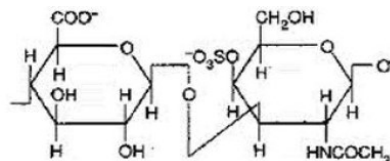
30

Ácido hialurónico:

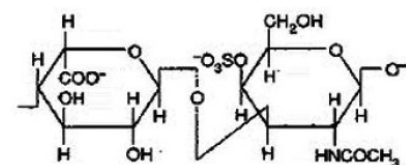


5

Condroitín sulfato:

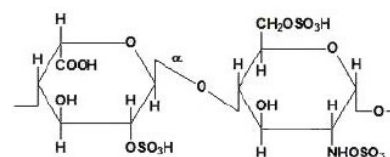


Dermatán sulfato:

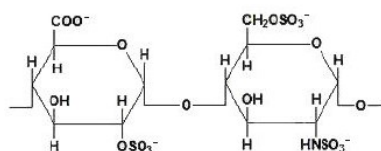


10

Heparina:

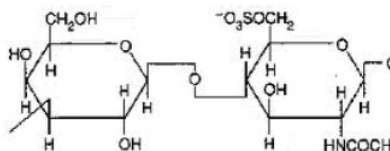


Heparán sulfato:



15

Keratán sulfato:



Fórmula 1: Estructura general de la unidad disacáridica para los diferentes tipos de glicosaminoglicanos

La heparina es un polisacárido de la familia de los glicosaminoglicanos, formado por ácido urónico (ácido L-idurónico o D-glucurónico) y D-glucosamina, unidos de forma alternada. La unidad disacáridica de repetición mayoritaria corresponde al disacárido trisulfatado, ácido 2-O-sulfo L-idurónico (1→4) 2-N-sulfo-6-O-sulfo D-glucosamina. El ácido L-idurónico puede estar 2-O-sulfatado y la D-glucosamina, puede estar N-sulfatada y/o 6-O-sulfatada, y en menor extensión N-acetilada ó 3-O-sulfatada (Mapping and quantification of the major oligosaccharides component of heparin. Linhardt RJ, Rice KG, Kim YS et al. Biochem J 1988; 254:781-787).

El origen de esta variabilidad estructural presente en las cadenas oligosacáridicas de heparina se encuentra en su biosíntesis y en el mecanismo de que lo regula. Así, en la primera etapa de biosíntesis, un fragmento tetrasacárido formado por glucosa-galactosa-galactosa-xilosa se une a un núcleo proteico, comenzando la biosíntesis de la cadena glicoproteica. A continuación, se van incorporando alternativamente residuos de ácido glucurónico (GlcA) y N-acetil gluco-

samina (GlcNAc) formando una cadena polisacáridica de aproximadamente 300 unidades. A la vez que se produce este alargamiento de la cadena y por la intervención de diversas enzimas, otras modificaciones se producen en ella. Así la acción de enzimas N-deacetilasa/N-sulfotransferasa produce la N-deacetilación y N-sulfatación de las unidades de GlcNAc, convirtiéndolas en N-sulfoglucosamina (GlcNS). Una C5 epimerasa cataliza la transformación de ciertas unidades de GlcA en ácido idurónico (IdoA), seguido de una 2-O-sulfatación por la acción de una 2-O-sulfotransferasa. A continuación una 6-O-sulfotransferasa, transfiere un grupo 6-O-sulfo a unidades de GlcNS y GlcNAc. Finalmente una 3-O-sulfotransferasa actúa sobre ciertas unidades de N-sulfo-6-O-sulfo glucosamina (GlcNS6S) generando residuos de N-sulfo-3,6-di-O-sulfo glucosamina (GlcNS3S6S).

La naturaleza aparentemente aleatoria e incompleta de la N-desacetilación inicial, es la principal responsable de la introducción de la heterogeneidad estructural en heparina en la primera fase de su biosíntesis. La variabilidad estructural en cuanto al grado y posiciones de sulfatación es el resultado de la naturaleza incompleta de modificaciones realizadas por las enzimas biosintéticas que conducen a la obtención de moléculas de heparina de sodio con un patrón de sustitución disacáridico variable.

La heparina se usa preferentemente como sal sódica, pero también puede usarse como sal de otros metales alcalinos o alcalinotérreos y se utiliza principalmente como medicamento antitrombótico y anticoagulante (Anticoagulant therapy for major arterial and venous thromboembolism. Tran HAM, Ginsberg JS. Basic principles and clinical practice. Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ (Ed). Lippincott Williams y Wilkins; 2006:1673-1688).

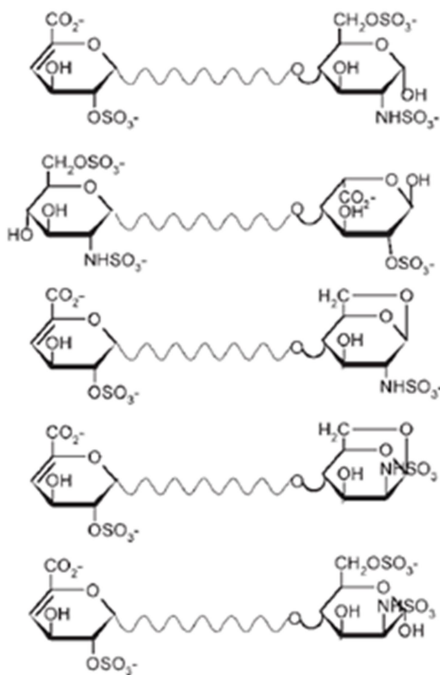
Las heparinas se pueden clasificar en función de su peso molecular en: heparina no fraccionada (HNF), heparina de bajo peso molecular (HBPM) con un peso molecular medio inferior a 8000 Da y heparina de muy bajo peso molecular (HMBPM) con un peso molecular medio inferior a 3000 Da (Chemoenzymatic synthesis of homogenous ultra low molecular weight heparins. Xu Y. et al. Science 2011; 334: 498-501). Las HBPM y HMBPM provienen de la despolimerización de la molécula original de HNF y sus procedimientos de fabricación pueden introducir en la

estructura de la molécula, ciertos residuos característicos de estos. Así, la estructura de la molécula resultante deriva por un lado de la estructura de la heparina utilizada como material de partida y de otra parte de los residuos característicos generados y característicos al método de fabricación usado.

5

El proceso de fabricación de enoxaparina sódica (β -eliminación por tratamiento alcalino sobre éster bencílico de heparina en medio acuoso) y bemiparina sódica (β -eliminación por tratamiento alcalino en medio no acuoso) genera como especies mayoritarias en los terminales el ácido 4,5-insaturado 2-O-sulfo urónico (Δ U2S), en el terminal no reductor, y 2-N-sulfo-6-O-sulfoglucosamina, en el terminal reductor de la molécula. Adicionalmente, el terminal no reductor puede presentar estructuras de ácido 4,5-insaturado urónico (Δ U). En el terminal reductor además del residuo anteriormente indicado, se puede encontrar 2-N-sulfo-6-O-sulfomanosamina (el tratamiento alcalino cataliza la epimerización en C2), además de otras dos especies 1,6-anhidro derivadas: 2-N-sulfo-1,6-anhidroglucosamina (1,6-an.A) y 2-N-sulfo-1,6-anhidromanosamina (1,6-an.M).

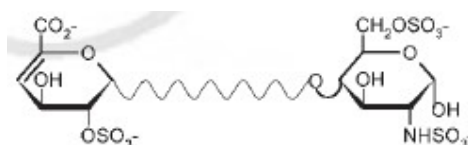
15



Fórmula 2: Estructuras presentes en el terminal reductor y no reductor en enoxaparina y

bemiparina sódica

En otras heparinas de bajo peso molecular también se generan residuos relacionados con su proceso de fabricación. Por ejemplo, la tinzaparina sódica, que se obtiene por un método de β -eliminación por tratamiento con heparinasas, presenta en su terminal no reductor la presencia de ácido 4,5-insaturado 2-O-sulfo urónico (Δ U2S).



Fórmula 3: Estructuras presentes en el terminal reductor y no reductor en tinzaparina sódica

La dalteparina sódica se obtiene por tratamiento con ácido nitroso que genera en el terminal reductor de la molécula un residuo 2,5-anhidro manitol.



Fórmula 4: Estructuras presentes en el terminal reductor y no reductor en dalteparina sódica

En la presente memoria descriptiva, por “residuo o resto monosacárido presente en cadenas de heparinas” se identifican aquellos residuos o componentes monosacáridos que se encuentran típicamente presentes en cadenas de HBPM/HNF/GAG. El listado de estos residuos se extiende a ácido 4,5-insaturado 2-O-sulfo urónico (Δ U2S), ácido 4,5-insaturado urónico (Δ U), 2-N-sulfo-1,6-anhidroglucosamina (1,6-an.A), 2-N-sulfo-1,6-anhidromanosamina (1,6-an.M), 2-N-sulfo-6-O-sulfoglucosamina (ANS6S), 2,5-anhidro manitol, N-sulfoglucosamina, ácido glucurónico, N-sulfo-6-O-sulfoglucosamina, ácido 2-O-sulfoidurónico, ácido idurónico, N-sulfo-3-O-sulfoglucosamina, N-sulfo-3,6-di-O-sulfoglucosamina ácido galacturónico, Xilosa, N-acetilglucosamina y N-acetil-6-O-sulfoglucosamina.

La espectroscopía RMN permite la identificación de los residuos que son propios de los procesos de fabricación de heparinas y de heparinas de bajo peso molecular.

- 5 Una de las ventajas asociadas al uso de la RMN para la caracterización estructural es que, para su análisis, las muestras no requieren derivatizaciones o fraccionamientos cromatográficos previos. Es decir, la muestra se analiza por RMN de forma directa, sin necesidad de tratamientos intermedios.
- 10 La espectroscopía de resonancia magnética nuclear se usa para la determinación de la secuencia de los residuos monosacáridicos presentes en estos compuestos y determina inequívocamente los puntos de N-acetilación y N- y O-sulfatación a lo largo de la cadena oligosacáridica. Adicionalmente, esta técnica permite determinar de forma específica la orientación de los enlaces anoméricos así como distinguir entre los epímeros ácido idurónico de
- 15 ácido glucurónico. (Advancing Analytical Methods for Characterization of Anionic Carbohydrate Biopolymers. Langeslay D.J. PhD Thesis UC Riverside 2013). Sin embargo, dado el alto grado de microheterogeneidad y polidispersidad de estos compuestos, la completa caracterización de heparinas y heparinas de bajo peso molecular todavía permanece como un reto en la actualidad.
- 20 Adicionalmente, esta técnica se puede utilizar para obtener información de aquellos residuos estructurales asociados a los procesos de obtención de heparinas y de heparinas de bajo peso molecular, tales como el estado de epimerización de los ácidos urónicos (ácido idurónico vs. ácido glucurónico), relación de 4,5-uronato residuos sulfatados y no sulfatados en el terminal no
- 25 reductor (para heparinas de bajo peso molecular obtenidas por un método de β -eliminación o tratamiento con heparinasas).
- Asimismo y debido a su alta sensibilidad, esta técnica se ha usado como técnica de screening para determinar impurezas presentes en glicosaminoglicanos (Analysis and characterization of
- 30 heparin impurities. Beni S. et al. Anal Bioanal Chem 2011, 399:527-539).

En el estado de la técnica se han descrito varios métodos y experimentos de RMN para la caracterización estructural de glicosaminoglicanos en general y heparinas y heparinas de bajo peso molecular en particular. Así, por ejemplo, se ha utilizado la espectroscopía de ^{13}C -RMN para la determinación del grado de sulfatación en heparina sódica de diferente origen animal
5 (Characterization of Sulfation Patterns of Beef and Pig Mucosal Heparins by Nuclear Magnetic Resonance. Casu B. et al. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 1996,46:472-477).

La espectroscopía de ^1H -RMN ha sido la técnica más ampliamente usada para el estudio de estos compuestos dado que se trata de un núcleo abundante y con una alta relación
10 giromagnética. La región entre 1,8 - 2,1 ppm comprende las señales correspondientes a los grupos N-acetilo o los grupos metilos de los terminales reductores que pueden ser incluidos sintéticamente. La región entre 2,8 – 4,6 ppm, comprende la mayoría de las señales del anillo sacarídico y presentan un alto grado de solapamiento entre ellas, lo que hace que sea
15 dificultoso extraer información estructural directamente de esta zona. Entre 4,6 - 6,0 ppm se encuentran las señales correspondientes a los protones anoméricos. Dada que es una zona mucho menos poblada de señales, es posible extraer una gran información de ella. Además en el caso de HBPMs obtenidas por mecanismo de β -eliminación, también contienen las señales correspondientes a los H4 de los terminales no reductores de la molécula.

20 Los experimentos bidimensionales (2D RMN) permiten superar los problemas presentes en los experimentos monodimensionales, básicamente debido al solapamiento de señales, y que además los espectros tienen dos dimensiones de frecuencia y otra adicional de intensidad de señal lo que les permite convertirse en una poderosa herramienta para la asignación de estructuras de oligosacáridos derivados de heparina (Characterization of currently marketed
25 heparin products: composition analysis by 2D-NMR. Keire D.A. et al. *Anal. Methods* 2013,5:2984-2994).

Los espectros TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY), suponen un excelente punto de partida para el análisis estructural de oligosacáridos ya que la información obtenida en éste,
30 permite correlacionar núcleos que se encuentran en el mismo sistema de espín, en este caso todos los protones dentro de un mismo monosacárido.

Otro experimento bidimensional de particular importancia para la caracterización estructural de este tipo de compuestos, es el ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation), que correlaciona desplazamientos químicos de protón con desplazamientos químicos de carbono 13, y permite asignar las estructuras primarias de oligosacáridos derivados de GAGs y la composición monosacáridica (Structural elucidation of the tetrasaccharide pool in enoxaparin sodium. Ozug J. et al. Anal. Bioanal. Chem. 2002,403:2733-2744; Structural features of low molecular weight heparins affecting their affinity to antithrombin. Bisio A. et al. Thromb. Hemost. 2009,102:865-873).

10

El incremento de dispersión espectral conseguida con esta técnica bidimensional, permite la cuantificación de las integrales de las señales que se superponen en los correspondientes espectros monodimensionales (Low-molecular-weight heparins: structural differentiation by bidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. Guerrini M. et al. Semin Thromb Hemost 2007,33:478-487).

15

La resonancia magnética nuclear es por definición una técnica espectroscópica cuantitativa ya que la intensidad de las líneas de resonancia es directamente proporcional al número de núcleos resonantes (espín). Esto hace que en principio sea posible una precisa determinación de la cantidad de estructuras moleculares.

20

El incremento de la intensidad de los campos magnéticos empleados en RMN ha permitido que los límites de detección hayan bajado de forma significativa. Sin embargo, la ausencia de métodos precisos que consideren y controlen tanto las medidas experimentales como el procesamiento y evaluación de los espectros hace que medidas realizadas sobre muestras idénticas en varios laboratorios puedan diferir significativamente (Validation of quantitative NMR. Malz F. y Jancke H. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2005,38:813-823).

25

La complejidad de los espectros de resonancia magnética nuclear de glicosaminoglicanos en general y heparinas y heparinas de bajo peso molecular y sus derivados en particular ha

30

hecho que hasta la fecha no se hayan desarrollado métodos específicos de validación que permitan la cuantificación de sus señales características, y por tanto la adecuada caracterización y diferenciación de estos compuestos.

- 5 De ahí que los inventores de la presente invención, han conseguido superar este obstáculo en el estado de la técnica, consiguiendo desarrollar un método que permite diferenciar de forma inequívoca unas heparinas de otras. Gracias al método desarrollado en la presente invención, los valores porcentuales de composición monosacáridica que se obtienen permiten diferenciar entre sí heparinas de bajo peso molecular obtenidas por diferentes procedimientos
- 10 de fabricación, así como también de heparina sódica y otros glicosaminoglicanos.

Resumen de la invención

- 15 Los inventores de la presente invención han desarrollado un método que permite la cuantificación de las señales características de glicosaminoglicanos en general y heparinas y heparinas de bajo peso molecular y sus derivados en particular a través de la utilización de resonancia magnética nuclear monodimensional de ^1H -RMN y/o bidimensional de ^1H - ^{13}C HSQC. La cuantificación de estas señales permite determinar la composición monosacáridica de las
- 20 cadenas oligosacáridicas de cada uno de estos compuestos, que es característica del compuesto.

- En consecuencia, en un primer aspecto la invención se dirige a un procedimiento de análisis de una composición que contiene residuos monosacáridicos presentes en cadenas de heparinas
- 25 mediante Resonancia Magnética Nuclear monodimensional de ^1H -RMN y/o bidimensional de ^1H - ^{13}C HSQC que comprende las etapas de:

- a. Proporcionar una composición que incluye al menos un residuo monosacárido presente en cadenas de heparinas y obtener su espectro de Resonancia Magnética Nuclear monodimensional de ^1H -RMN y/o bidimensional de ^1H - ^{13}C HSQC utilizando ácido dimetilmalónico como referencia interna, e
- 30 b. Identificar en el espectro RMN la presencia o la ausencia de al menos una señal de al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en: ácido

5 4,5-insaturado 2-O-sulfo urónico (Δ U2S), ácido 4,5-insaturado urónico (Δ U), 2-N-sulfo-1,6-anhidroglucosamina (1,6-an.A), 2-N-sulfo-1,6-anhidromanosamina (1,6-an.M), 2-N-sulfo-6-O-sulfoglucosamina (ANS6S), 2,5-anhidro manitol, N-sulfoglucosamina, ácido glucurónico, N-sulfo-6-O-sulfoglucosamina, ácido 2-O-sulfoidurónico, ácido idurónico, N-sulfo-3-O-sulfoglucosamina, N-sulfo-3,6-di-O-sulfoglucosamina ácido galacturónico, Xilosa, N-acetilglucosamina y N-acetil-6-O-sulfoglucosamina,

10 caracterizado porque la presencia o ausencia de las citadas señales en una determinada proporción relativa de sus integrales normalizadas conforma un patrón que permite identificar la heparina de la que procede el residuo monosacárido comparando el patrón obtenido en el análisis con un patrón estándar previamente obtenido para cada heparina en las mismas condiciones.

15 La cuantificación adecuada de las señales características de estos productos así como de su composición monosacáridica o residuos característicos, permite diferenciar adecuadamente unos polisacáridos de otros así como su procedencia, y en el caso de las heparinas de bajo peso molecular, confirmar que los productos se han fabricado de acuerdo al método declarado.

20 Esta cuantificación de los residuos se obtiene en valores porcentuales y de forma relativa a la estructura completa de cada heparina. Obteniendo una "foto" característica de cada una de las estructuras, lo que permite una deducción e identificación inequívoca tanto de la heparina analizada como del procedimiento por el que se ha obtenido. De este modo, el procedimiento de la presente invención se puede utilizar tanto como método o sistema de calidad (para valorar si las heparinas analizadas corresponden con un estándar identificado o bien están siendo adulteradas) y como método de análisis y determinación de señales características de nuevas estructuras de heparinas, de las que posteriormente se podrá utilizar el método de la invención como método o sistema de calidad.

30 Además, la aprobación ante las autoridades sanitarias de biosimilares y/o genéricos de ciertas heparinas de bajo peso molecular, como es el caso de Enoxaparina Sódica, se produce tras un adecuado ejercicio de comparabilidad entre el biosimilar/genérico y la molécula de referencia, que debe demostrar entre otros aspectos, el adecuado grado de similitud estructural entre ambos

productos. Uno de los aspectos básicos a nivel estructural que es necesario demostrar, es que la proporción relativa de los monosacáridos que forman sus cadenas oligosacarídicas y tras evaluación estadística, cumplan criterios de biosimilitud. Para ellos el método de la presente invención es especialmente selectivo.

5

Los inventores de la presente invención han comprobado que, aunque la caracterización estructural por resonancia magnética nuclear ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de estos compuestos, sin embargo no hay disponible en la literatura métodos cuantitativos de análisis de glicosaminoglicanos mediante RMN. La ausencia de estos métodos impide la adecuada comparabilidad entre muestras idénticas estudiadas y evaluadas bajo condiciones experimentales no adecuadamente fijadas.

10

Así, se puede encontrar en la literatura, publicaciones en las que los valores de proporción relativa que se aportan para los diversos residuos componentes de estos compuestos difieren significativamente unas de otras, lo que indica claramente que son métodos inadecuados (Generics versions of enoxaparin available for clinical use in Brazil are similar to the original drug. Glauser B.F., Vairo B.C., Oliveira C.P.M., Cinelli L.P., Pereira M.S. y Mourao P.A.S. J Thromb Haemost 2011,9;1419-1422).

15

Con el objetivo de establecer un método cuantitativo selectivo para la determinación de la proporción de las señales correspondientes a estos residuos presentes en la estructura de estos compuestos, que permita la adecuada comparación entre resultados y que permita soslayar el error asociado a las condiciones en que se realice los experimentos de RMN, los inventores han encontrado que la utilización del ácido dimetilmalónico (DMMA) como patrón interno en experimentos de ¹H RMN como HSQC para la cuantificación relativa de las señales correspondientes a los diferentes monosacáridos componentes, es adecuada ya que entre otros aspectos presenta un tiempo de relajación longitudinal (T1), de menos de 1 segundo análogo a los T1 de los protones y carbonos anoméricos (Molecular Weight of Heparin using ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Desai U.R. y Linhardt R.J., J Pharm Sci 1995,84(2);212-215), lo cual permite una buena transferencia de polarización y por tanto un aumento de la intensidad de las señales, lo que lo hace adecuado para este

20

25

30

propósito.

Así el procedimiento para en análisis por RMN de estos compuestos se caracteriza, en primer lugar, por la utilización de ácido dimetilmalónico como estándar interno para la cuantificación de las señales características de estos productos, tanto utilizando ^1H -RMN como ^1H - ^{13}C HSQC.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la selección del ácido dimetilmalónico (DMMA) como estándar interno en su aplicación tanto a ^1H -RMN como a ^1H - ^{13}C HSQC permite la determinación cuantitativa de forma porcentual de las señales características en glicosaminoglicanos típicamente relacionados con heparinas con una elevada selectividad, exactitud, repetitividad y linealidad entre la señal del espectro RMN y la concentración de los residuos característicos del glicosaminoglicano analizado lo que posibilita el desarrollo de un método de análisis cuantitativo de dichos glicosaminoglicanos inexistente hasta la fecha.

15

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esquema del proceso de biosíntesis de heparina

20 **Figura 2:** Selectividad. Espectros de ^1H -RMN

Figura 3: Selectividad. Espectros de ^1H - ^{13}C HSQC

Figura 4: Linealidad ^1H -RMN

25

Figura 5: Linealidad ^1H - ^{13}C HSQC

Figura 6: Espectro de ^1H -RMN de enoxaparina sódica

30 **Figura 7:** Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC de enoxaparina sódica

Abreviaturas y acrónimos

En la presente memoria descriptiva se utilizarán las siguientes abreviaturas y acrónimos:

	RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
5	HSQC:	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
	GAG:	Glicosaminoglicano
	HNF:	Heparina No Fraccionada
	HBPM:	Heparina de Bajo Peso Molecular
	HMBPM:	Heparina de Muy Bajo Peso Molecular
10	Da:	Dalton
	Δ U2S:	Ácido 4,5-insaturado 2-O-sulfo urónico
	Δ U:	Ácido 4,5-insaturado urónico
	1,6-an.A:	2-N-sulfo-1,6-anhidroglucosamina
	1,6-an.M:	2-N-sulfo-1,6-anhidromanosa
15	TOCSY:	TOTAL Correlation Spectroscopy
	TSP:	Sal sódica del ácido 3-(Trimetilsilil)-Propiónico-D4
	DMMA:	Ácido dimetilmalónico
	MHz:	Megahercio
	ppm:	parte por millón
20	δ :	desplazamiento químico
	SW:	Ancho espectral
	TD:	Dominio temporal
	T1:	Tiempo de relajación longitudinal
	ANS:	N-sulfoglucosamina
25	G:	Ácido glucurónico
	ANS6S:	N-sulfo-6-O-sulfoglucosamina
	I2S:	Ácido 2-O-sulfo-idurónico
	I:	Ácido idurónico
	ANS3S:	N-sulfo-3-O-sulfoglucosamina
30	Gal:	Ácido galacturónico
	Xyl:	Xilosa

ANAc:	N-acetilglucosamina
A6S:	6-O-sulfoglucosamina
A6OH:	Glucosamina
G2S:	Ácido 2-O-sulfoglucurónico
5 M:	Manosamina
MNS6S:	N-sulfo-6-O-sulfomanosamina
Epox:	Epóxido
α red:	anómero α
β red:	anómero β

10

Descripción detallada de la invención

Ensayos experimentales

15 Los ensayos de RMN cuantitativo se han realizado usando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) Bruker AVIII-600 ó Bruker AVIII-800. Como reactivos se ha utilizado óxido de deuterio (D₂O) 99,9%, sal sódica del ácido 3-(Trimetilsilil)-Propiónico-D4 (TSP) y ácido Dimetil Malónico (DMMA, standard for quantitative NMR, TraceCERT grade) como patrón interno.

20

a) Condiciones del equipo

- Frecuencia: 1H: 600 / 800 MHz, 13C: 150,9 / 201,2 MHz
- Temperatura: 298 K

25

b) Parámetros de adquisición (¹H RMN cuantitativo)

- Pulso de 90°: a determinar en el espectro de 1H cualitativo
- Ventana de adquisición: SW=10-12 ppm/TD=64-128k
- Tiempo entre pulsos d1, que cumpla d1+AQ≥20s
- N° de escanes: 12

30

c) Parámetros de adquisición (HSQC)

- Pulso de 90° de ^1H : a determinar en el espectro de ^1H cualitativo
- Ventana de adquisición: SW2 (^1H)=6 ppm / TD(F2)=1k
SW1 (^{13}C)= 120 ppm / TD(F1)=256-384
- Tiempo entre pulsos d1 =1,8-2 s
- 5 - N° de escanes:12

- d) Parámetros de procesado (^1H)
- Ventana de procesado: SI=64-256K
- Función de procesado: Ninguna
- 10 - Ajuste de fase: manual
- Ajuste de línea base: automático (abs)

- e) Parámetros de procesado (HSQC)
- Ventana de procesado: SI(F2)=2k
- 15 - Función de procesado: QSINE, SSB=2
- Ajuste de fase: manual
- Ajuste de línea base: automático

- f) Preparación de la muestra se prepararon las siguientes disoluciones:
- 20 - Disolución A [TSP] 1mg/ mL
- Disolución B [D2O-TSP] 0,002 mg/mL: 40 μL A [TSP] + 19,96 mL D2O, Volumen total = 20 mL
- Disolución C [DMMA] 1,2 mg/ mL
- Muestra problema: 50 mg de producto a estudiar en 500 μL de la disolución B
- 25 [D2O-TSP] y añadir 100 μL de la disolución C [DMMA] de ácido dimetilmalónico y poner en tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

- g) Procedimiento
- 30 El tubo de RMN que contiene la muestra se introduce en el espectrómetro. A continuación se ajusta la homogeneidad del campo magnético y se optimiza la sintonía de la sonda para los

núcleos de ^1H y ^{13}C . Se realiza entonces un espectro de ^1H cualitativo, con parámetros similares a los descritos anteriormente, excepto los siguientes:

Tiempo entre pulsos $d1 = 1-2\text{s}$

Nº de escanes: 1-4

5

Se determina entonces el valor del pulso de 90° con el programa automático pulsecal (TOPSPIN). A continuación se realiza el espectro de ^1H cuantitativo, con los parámetros indicados en el método analítico y el valor del pulso de 90° (P1) determinado previamente. Después se obtiene el espectro HSQC con los parámetros indicados anteriormente. Los espectros obtenidos se procesan entonces según los parámetros indicados anteriormente, tomando como referencia de desplazamiento químico la señal de TSP-d4 a 0 ppm.

10

La señal del ácido dimetilmalónico aparece a los siguientes desplazamientos químicos:

- ^1H RMN: singlete que aparece a 1,2-1,4 ppm

15

- HSQC: señal a 1,2-1,4 y 26-27 ppm

Los parámetros evaluados para determinar la validación del método para RMN cuantitativo han sido los siguientes:

20 Selectividad

Determina la capacidad del método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.

25

Los datos obtenidos en los espectros de ^1H RMN en estos experimentos, fueron:

	Muestra	Composición	Desplazamiento químico, ppm
30	I, disolvente	D ₂ O	4,79
	II, referencia desplazamiento químico	D ₂ O-TSP	0,00

III, patrón interno	D ₂ O-DMMA	1,42
IV, muestra GAG	D ₂ O-TSP-DMMA-GAG	1,8-8,0

Y en los espectros de ¹H ¹³C-HSQC:

5	Muestra	Composición	Desplazamiento químico ¹H, ppm	Desplazamiento químico ¹³C, ppm
	III, patrón interno	D ₂ O-DMMA	1,42	25,42
10	IV, muestra GAG	D ₂ O-TSP-DMMA-GAG	1,8-8,0	24-112

Se comprueba que no hay interferencia entre señales tanto en los espectros de ¹H RMN como en los de ¹H ¹³C-HSQC (Figuras 2 y 3). Esto demuestra que el método es capaz de discriminar sin interferencias las señales que componen la estructura del compuesto a estudiar, de las de otros productos presentes en la muestra tales como el disolvente (óxido de deuterio, D₂O), el patrón interno (ácido dimetilmalónico, DMMA) y la referencia de desplazamiento químico (TSP-d₄).

Límite de cuantificación y linealidad

20 Bajo estos parámetros se determina por un lado la cantidad mínima de analito que puede ser adecuadamente cuantificado de forma precisa y exacta y de otra parte, la capacidad del método de obtener resultados directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo establecido.

25 Para la evaluación del límite de cuantificación y la linealidad se cuantificaron las integrales de las señales RMN del DMMA (es decir, la integral del área de la señal de RMN correspondiente al DMMA) sobre enoxaparina sódica dopada a 7 niveles de concentración del patrón interno, a partir de pesadas independientes y por triplicado. Estos niveles corresponden a las siguientes concentraciones de trabajo:

- 0,2 mM: 13,5 % de la concentración de trabajo

- 0,3 mM: 20,3 % de la concentración de trabajo
- 0,76 mM: 50 % de la concentración de trabajo
- 1,2 mM: 80,1 % de la concentración de trabajo
- 1,5 mM: 100 % de la concentración de trabajo
- 5 - 1,8 mM: 120 % de la concentración de trabajo
- 2,27 mM: 150,2 % de la concentración de trabajo

El criterio de aceptación establecido para cumplir este criterio de linealidad es que en la recta obtenida el coeficiente de correlación para ambos experimentos sea $\geq 0,99$. En las Figuras 4 y 5 se representa la gráfica de que representa los valores de integral de la señal del DMMA vs concentración de DMMA (mM), para los espectros de ^1H RMN y ^1H ^{13}C -HSQC. El criterio de aceptación se cumple ampliamente tanto para uno como para otro.

El límite de cuantificación se establece para una concentración de DMMA de 0,20 mM. Así las señales de la muestra estudiada cuya intensidad sea menor a la intensidad de la señal del DMMA correspondiente a esta concentración, no pueden ser adecuadamente cuantificadas y por tanto no pueden tomarse para la determinación de la proporción relativa de los residuos presentes en la molécula.

20 Exactitud

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o de referencia y el valor experimental encontrado. Para el cálculo del valor experimental en la concentración de las muestras a evaluar se tiene en cuenta las ecuaciones de la recta obtenidas en el apartado anterior de linealidad.

25 La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de patrón interno:

$$\text{Porcentaje de recuperación (R)} = \frac{X_m}{\mu} \times 100$$

30

Donde:

Xm: valor medio hallado

μ : valor aceptado como verdadero

5 El criterio de aceptación establecido para cumplir este criterio de exactitud es que los valores de recuperación estén comprendidos entre el 70,0-130,0 % para la concentración correspondiente al límite de concentración y del 80,0-120,0 % para el resto de niveles.

Los datos obtenidos para los experimentos de ¹H RMN y HSQC, fueron los siguientes:

a) ¹H RMN

10	Concentración, mM	Conc. Calculada, mM	Recuperación, ¹H RMN
	0,204	0,228	111,77
	0,307	0,330	107,31
	0,758	0,737	97,26
	1,212	1,175	96,90
15	1,514	1,488	98,29
	1,817	1,810	99,65
	2,274	2,318	101,94

b) HSQC

20	Concentración, mM	Conc. Calculada, mM	Recuperación, HSQC
	0,204	0,243	119,17
	0,307	0,337	109,81
	0,758	0,727	95,96
	1,212	1,140	94,03
25	1,514	1,488	98,29
	1,817	1,823	100,32
	2,274	2,328	102,37

30 La conclusión extraída de este ensayo tanto para el experimento de ¹H RMN como de HSQC es la idoneidad en el cumplimiento de los criterios de aceptación para el parámetro exactitud para aquellas señales correspondientes a la muestra, con intensidad superior a la del límite de

cuantificación.

Precisión - Repetibilidad

- 5 Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

Para ello se realizaron tres análisis consecutivos para cada concentración. La repetibilidad de un método se expresa como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV (\%) = \frac{s}{X} \times 100$$

Donde:

15 s: desviación estándar

X: media aritmética de los resultados.

El criterio de aceptación establecido para cumplir este criterio de exactitud es el coeficiente de variación para todos los niveles sea $\leq 7\%$.

20 Los datos obtenidos para ambos experimentos fueron los siguientes:

	Concentración, mM	CV, % ¹H RMN	CV, %HSQC
	0,204	5,55	3,40
	0,307	0,09	2,29
25	0,758	1,62	1,45
	1,212	1,74	2,52
	1,514	1,41	1,01
	1,817	2,16	3,99
	2,274	2,30	2,73

30

La conclusión extraída de este ensayo tanto para el experimento de ¹H RMN como de HSQC; es la idoneidad en el cumplimiento de los criterios de aceptación para el parámetro exactitud para aquellas señales correspondientes a la muestra, con intensidad superior a la del límite de

cuantificación.

EJEMPLOS

- 5 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan a continuación sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

10 **EJEMPLO 1**

Estudio por ^1H RMN de enoxaparina sódica.

- 15 Se disuelven 50 mg de enoxaparina Sódica en 500 μL de una solución de D_2O -TSP (solución B) y se añaden 100 μL de solución de DMMA (solución C). La disolución resultante se introduce en un tubo de 5 mm de diámetro.

La concentración resultante de DMMA en la disolución a analizar es de 1,5 mM.

- 20 Los experimentos se realizan en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker AVIII-800.

Las principales señales identificadas son las siguientes:

25	Señal	Desplazamiento químico, ppm	Señal	Desplazamiento químico, ppm
	H4 ΔU2S	5,992	H1 G	4,628
	H4 ΔU2	5,825	H6 ANS6S	4,344
30	H1 1,6-AnA	5,616	H6' ANS6S	4,210
	H1 ANS(-G)	5,585	H3 ANS	3,670
	H1 1,6-AnM	5,569	H2 ANS3S	3,395

	H1 ΔU2S	5,509	H2 ANS	3,293
	H1 ANS6S	5,405	NAc	2,047
	H1 I2S	5,228	DMMA	1,320
	H1 I	5,012	TSP	0,069
5	H5 I2S	4,836		

Una vez obtenidos los valores de las integrales de las señales tanto del DMMA como del resto de los residuos, se procede a obtener los valores normalizados de las señales de dichos residuos dividiendo el valor de sus integrales por el valor de la integral correspondiente a la señal del DMMA. Se puede realizar esta normalización ya que la concentración de patrón interno se mantiene constante con respecto a la concentración de residuo para todos los experimentos, obviando así la variabilidad inter-experimental que pueda darse en el análisis de una serie de varios lotes de producto.

Una vez obtenidos los valores normalizados de los residuos, se calcula el porcentaje relativo de cada uno de ellas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ señal X} = \frac{\text{valor normalizado señal X}}{\sum \text{valor normalizado todas las señales}} \times 100$$

Para clarificar los pasos realizados se muestran los resultados obtenidos para una serie de cuatro muestras M1, M2, M3 y M4 de enoxaparina sódica:

En los experimentos realizados, se obtuvieron los siguientes valores de integral de cada una de las señales seleccionadas:

<u>Señal</u>	<u>Integral</u>			
	M 1	M 2	M 3	M 4

	H4 ΔU2S	2767732,83	2988384,02	3075705,31	2332763,55
	H4 ΔU	114294,94	135658,19	143037,09	94201,86
	H1 1,6-an.A	404060,73	472871,53	509930,86	351978,17
	H1 1,6-an.M	2535227,20	2700027,94	2844751,53	2160178,72
5	H1 ΔU2S	3541377,06	3818336,16	3951288,34	2999870,34
	H1 ANS6S	10350026,69	10716882,48	10780945,33	8442504,14
	H1 I2S	8922576,12	9202191,38	9486264,66	7346708,47
	H5 I2S	8924825,12	9540022,53	10041127,64	7751650,03
	H2 ANS	16351247,22	16802874,61	17051664,14	13189968,22
10	NAc	8054931,36	7973188,48	8124533,56	6388424,34
	DMMA	1464255,27	1415020,17	1485242,95	1279612,94

Donde M corresponde a muestra.

- 15 Para obtener los valores normalizados de las integrales de las señales a estudio, se dividen estas por el valor de la integral del DMMA:

	Señal	Integral normalizada			
		M 1	M 2	M 3	M 4
20	H4 ΔU2S	1,890	2,112	2,071	1,823
	H4 ΔU	0,078	0,096	0,096	0,074
	H1 1,6-an.A	0,276	0,334	0,343	0,275
	H1 1,6-an.M	1,731	1,908	1,915	1,688
	H1 ΔU2S	2,419	2,698	2,660	2,344
25	H1 ANS6S	7,068	7,574	7,259	6,598

	H1 I2S	6,094	6,503	6,387	5,741
	H5 I2S	6,095	6,742	6,761	6,058
	H2 ANS	11,167	11,875	11,481	10,308
	NAc	5,501	5,635	5,470	4,992
5	DMMA	1,000	1,000	1,000	1,000

Y finalmente, a partir de estos valores normalizados, se calcula la proporción relativa de cada una de estas señales con respecto al conjunto de todas las señales:

10	Señal	Proporción relativa, %			
		M 1	M 2	M 3	M 4
	H4 ΔU2S	4,47	4,64	4,66	4,57
	H4 ΔU	0,18	0,21	0,22	0,18
	H1 1,6-an.A	0,65	0,73	0,77	0,69
15	H1 1,6-an.M	4,09	4,20	4,31	4,23
	H1 ΔU2S	5,72	5,93	5,99	5,88
	H1 ANS6S	16,70	16,65	16,33	16,54
	H1 I2S	14,40	14,30	14,37	14,39
	H5 I2S	14,40	14,83	15,21	15,18
20	H2 ANS	26,39	26,11	25,83	25,83
	NAc	13,00	12,39	12,31	12,51

La cuantificación de las señales características y bien diferenciadas de enoxaparina sódica (generalmente aquellas correspondientes a los protones anoméricos, H1) se muestran en la siguiente tabla con los valores de proporción relativa observados:

	Señal	Desplazamiento químico, ppm	Proporción relativa, %
	H4 ΔU2S	5,99	4,3-4,7
	H4 ΔU	5,82	0,2
5	H1 1,6-an.A	5,62	0,7-0,9
	H1 1,6-an.M	5,57	4,1-4,4
	H1 ΔU2S	5,51	5,7-6,0
	H1 ANS6S	5,40	16,1-16,7
	H1 I2S	5,23	13,1-14,4
10	H5 I2S	4,84	14,3-16,3
	H2 ANS	3,29	24,3-26,6
	NAc	2,05	12,0-15,3

El conjunto de las señales correspondientes a los picos encontrados en un espectro RMN determinado, ya sea ^1H -RMN monodimensional y/o ^1H - ^{13}C HSQC bidimensional, o la ausencia de las mismas, en las proporciones relativas de sus integrales normalizadas indicadas por el parámetro “proporción relativa (%)” es en lo que en la presente memoria descriptiva se denomina “patrón de señales” o simplemente “patrón”.

20 EJEMPLO 2

La misma solución empleada en el ejemplo 1, se utiliza para la realización del estudio por ^1H - ^{13}C HSQC. Las principales señales identificadas son las siguientes:

	Señal	$\delta^{13}\text{C}$, ppm	$\delta^1\text{H}$, ppm	Señal	$\delta^{13}\text{C}$, ppm	$\delta^1\text{H}$, ppm
25	C4-H4 ΔU	110,71	5,82	C3-H3 Gal	85,45	3,78
	C4-H4 ΔU2S	108,97	5,99	C3-H3 Gal	84,85	3,83
	C1-H1 G // Gal	106,62	4,66	C4-H4 ANS6S(-G)//80,94		3,84
				ANS6S red		
30	C1-H1 Xyl	105,79	4,45	C2-H2 I2S	78,53	4,34
	C1-H1 G(-ANAc)	105,13	4,50	C3-H3 Xyl	77,82	3,72
	C1-H1 I(-A6S)	104,94	5,01	C2-H2 ΔU2S	77,42	4,62

	C1-H1 G(-ANS)	104,77	4,60	C2-H2 G(-AN6S)	75,70	3,40
	C1-H1 I(-A6OH)	104,67	4,94	C3-H3 ANS6S (-G)	72,47	3,66
	C1-H1 Gal	104,30	4,54	C3-H3 ANS6S red	72,29	3,77
	C1-H1 1,6-an.A	104,22	5,61	C5-H5 I2S	72,01	4,83
5	C1-H1 G (-ANS3S)	103,91	4,61	C3-H3 I2S	71,87	4,21
	C1-H1 1,6-an.M	103,91	5,57	C5-H5 ANS6S(-G)	71,72	4,09
	C1-H1 ΔU	103,88	5,16	C5-H5 MNS6S red	70,98	4,15
	C1-H1 G2S	102,99	4,75	C5-H5 ANS6S red	70,64	4,12
10	C1-H1 I2S	102,09	5,22	C6-H6 1,6-an.A// 1,6-an.M	67,53	3,77
	C1-H1 I2S(-1,6- an.M)	101,59	5,36	C5-H5 Xyl	65,89	4,12
	C1-H1 ANS(-G)	100,50	5,58	C5-H5 Xyl	65,86	3,40
	C1-H1 ANAc	100,23	5,31	C3-H3 ΔU2S	65,75	4,32
15	C1-H1 ΔU2S	100,18	5,51	C6-H6 Gal	63,90	3,74
	C1-H1 ANS(-I2S)	99,78	5,40	C2-H2 ANS6S red// ANS(-I2S)	60,82	3,28
	C1-H1 ANS6S	99,43	5,43	C2-H2 ANS6S(-G)	60,52	3,29
	C1-H1 ANS,3S	99,06	5,51	C2-H2 MNS6S red	60,38	3,60
20	C1-H1 ANS βred	98,73	4,71	C2-H2 1,6-an.A	58,50	3,21
	C1-H1 ANS(-I)	98,42	5,34	C2-H2 ANAc	56,68	3,92
	C1-H1 M αred	95,74	5,39	C2-H2 1,6-an.M	55,09	3,47
	C1-H1 I2S αred	95,70	5,42	DMMA	26,73	1,32
	C1-H1 I2S βred	94,76	4,97	NAc	24,87	2,05
25	C1-H1 ANS αred// ANS6S red	93,97	5,45			

Estas señales se pueden asociar a componentes monosacáridicos de la molécula, de modo que la cuantificación de éstas permite la determinación de su composición monosacáridica.

30

Las integrales para cada una de estas señales fueron normalizadas a partir del valor fijado para la integral del DMMA, usando el mismo procedimiento explicado para los experimentos ¹H RMN. La cuantificación de las señales características de enoxaparina sódica se muestra

en la siguiente tabla:

	Señal	Proporción relativa, %
	C1-H1 ANS-I2S	25,6-26,9
5	C1-H1 ANS-I	2,6-3,0
	C1-H1 ANS-G	5,1-5,5
	C1-H1 ANS.3S	1,5-1,7
	C1-H1 ANAc	2,7-3,5
	C1-H1 ANAc-ared	< LC
10	C1-H1 ANS-red	3,8-4,9
	C1-H1 1.6-an.A	1,2-1,5
	C1-H1 1.6-an.M	1,6-1,9
	C1-H1 MNS-ared	1,0-1,3
	C1-H1 I2S	24,5-27,5
15	C1-H1 I-A6S	2,4-2,7
	C1-H1 I-A6OH	0,3-0,4
	C1-H1 G-ANS,3S	1,4-1,6
	C1-H1 G-ANS	4,2-4,4
	C1-H1 G-ANAc	1,9-2,6
20	C1-H1 G2S	1,1-1,6
	C1-H1 ΔU2S	11,5-12,4
	C1-H1 ΔU	0,3-0,5
	C1-H1 I2S-red	1,0-1,4
	C5-H5 Gal-A	<LC-0,5
25	Epoxy	<LC-0,4

EJEMPLO 3

Estudio por ¹H RMN de bemiparina sódica.

30

Las principales señales identificadas son las siguientes:

	Señal	Desplazamiento químico, ppm	Señal	Desplazamiento químico, ppm
5	H4 ΔU2S	5,992	H1 G	4,628
	H4 ΔU	5,825	H6 ANS6S	4,344
	H1 1,6-AnA	5,616	H6' ANS6S	4,210
	H1 ANS(-G)	5,585	H3 ANS	3,670
	H1 1,6-AnM	5,569	H2 ANS3S	3,395
10	H1 ΔU2S	5,509	H2 ANS	3,293
	H1 ANS6S	5,405	NAc	2,047
	H1 I2S	5,228	DMMA	1,320
	H1 I	5,012	TSP	0,069
	H5 I2S	4,836		

15 La cuantificación de las señales características y bien diferenciadas de bemiparina sódica (generalmente aquellas correspondientes a los protones anoméricos, H1) se muestran en la siguiente tabla con los valores de proporción relativa observados para una serie de seis muestras:

20	Señal	Desplazamiento químico, ppm	Proporción relativa, %
	H4 ΔU2S	5,99	3,7-5,7
	H4 ΔU	5,82	0,2-2,5
	H1 1,6-an.A	5,62	0,5-2,5
	H1 1,6-an.M	5,57	2,5-6,0
25	H1 ΔU2S	5,51	7,0-10,7
	H1 ANS6S	5,40	19,0-21,3
	H1 I2S	5,23	13,8-18,5
	H2 ANS	3,29	18,7-26,3
	NAc	2,05	9,4-14,4

30

EJEMPLO 4

La misma solución empleada en el ejemplo 3, se utiliza para la realización del estudio por ^1H - ^{13}C HSQC. Las principales señales identificadas son las siguientes:

	Señal	$\delta^{13}\text{C}$, ppm	$\delta^1\text{H}$, ppm	Señal	$\delta^{13}\text{C}$, ppm	$\delta^1\text{H}$, ppm
5	C4-H4 ΔU	110,71	5,82	C3-H3 Gal	85,45	3,78
	C4-H4 $\Delta\text{U}2\text{S}$	108,97	5,99	C3-H3 Gal	84,85	3,83
	C1-H1 G // Gal	106,62	4,66	C4-H4 ANS6S(-G)//80,94		3,84
				ANS6S red		
	C1-H1 Xyl	105,79	4,45	C2-H2 I2S	78,53	4,34
10	C1-H1 G(-ANAc)	105,13	4,50	C3-H3 Xyl	77,82	3,72
	C1-H1 I(-A6S)	104,94	5,01	C2-H2 $\Delta\text{U}2\text{S}$	77,42	4,62
	C1-H1 G(-ANS)	104,77	4,60	C2-H2 G(-AN6S)	75,70	3,40
	C1-H1 I(-A6OH)	104,67	4,94	C3-H3 ANS6S (-G)	72,47	3,66
	C1-H1 Gal	104,30	4,54	C3-H3 ANS6S red	72,29	3,77
15	C1-H1 1,6-an.A	104,22	5,61	C5-H5 I2S	72,01	4,83
	C1-H1 G (-ANS3S)	103,91	4,61	C3-H3 I2S	71,87	4,21
	C1-H1 1,6-an.M	103,91	5,57	C5-H5 ANS6S(-G)	71,72	4,09
	C1-H1 ΔU	103,88	5,16	C5-H5 MNS6S red	70,98	4,15
	C1-H1 G2S	102,99	4,75	C5-H5 ANS6S red	70,64	4,12
20	C1-H1 I2S	102,09	5,22	C6-H6 1,6-an.A// 1,6-an.M	67,53	3,77
	C1-H1 I2S(-1,6-an.M)	101,59	5,36	C5-H5 Xyl	65,89	4,12
	C1-H1 ANS(-G)	100,50	5,58	C5-H5 Xyl	65,86	3,40
25	C1-H1 ANAc	100,23	5,31	C3-H3 $\Delta\text{U}2\text{S}$	65,75	4,32
	C1-H1 $\Delta\text{U}2\text{S}$	100,18	5,51	C6-H6 Gal	63,90	3,74
	C1-H1 ANS(-I2S)	99,78	5,40	C2-H2 ANS6S red// ANS(-I2S)	60,82	3,28
	C1-H1 ANS6S	99,43	5,43	C2-H2 ANS6S(-G)	60,52	3,29
30	C1-H1 ANS,3S	99,06	5,51	C2-H2 MNS6S red	60,38	3,60
	C1-H1 ANS β red	98,73	4,71	C2-H2 1,6-an.A	58,50	3,21
	C1-H1 ANS(-I)	98,42	5,34	C2-H2 ANAc	56,68	3,92

	C1-H1 M α red	95,74	5,39	C2-H2 1,6-an.M	55,09	3,47
	C1-H1 I2S α red	95,70	5,42	DMMA	26,73	1,32
	C1-H1 I2S β red	94,76	4,97	NAc	24,87	2,05
5	C1-H1 ANS α red// ANS6S red	93,97	5,45			

Estas señales se pueden asociar a componentes monosacáridos de la molécula, de modo que la cuantificación de éstas permite la determinación de su composición monosacárida.

10 Las integrales para cada una de estas señales fueron normalizadas a partir del valor fijado para la integral del DMMA, usando el mismo procedimiento explicado para los experimentos ^1H RMN. La cuantificación de las señales características de bemiparina sódica se muestra en la siguiente tabla:

15	Señal	Proporción relativa, %
	C1-H1 ANS-I2S	26,5-30,6
	C1-H1 ANS-I	1,7-5,3
	C1-H1 ANS-G	2,1-3,8
	C1-H1 ANS.3S	0,6-2,5
20	C1-H1 ANAc	1,7-3,0
	C1-H1 ANAc- α red	< LC
	C1-H1 ANS-red	2,6-5,4
	C1-H1 1.6-an.A	< 1,1
	C1-H1 1.6-an.M	<1,0
25	C1-H1 MNS- α red	0,9-2,3
	C1-H1 I2S	30,4-34,9
	C1-H1 I-A6S	1,4-2,6
	C1-H1 I-A6OH	<0,2
	C1-H1 G-ANS,3S	<2,5
30	C1-H1 G-ANS	1,9-3,6
	C1-H1 G-ANAc	0,4-1,4
	C1-H1 G2S	<0,5

C1-H1 ΔU2S	10,9-14,9
C1-H1 ΔU	0,6-1,6
C1-H1 I2S-red	<0,5
C5-H5 Gal-A	<0,3

5

EJEMPLO 5

Estudio por ¹H RMN de dalteparina sódica.

10 Las principales señales identificadas son las siguientes:

	Señal	Desplazamiento químico, ppm	Señal	Desplazamiento químico, ppm
15	H1 ANS(-G)	5,585	H6' ANS6S	4,210
	H1 ANS6S	5,405	H3 ANS	3,670
	H1 I2S	5,228	H2 ANS3S	3,395
	H1 I2S-(AM.ol)	5,178	H2 ANS	3,293
	H1 I	5,012	NAC	2,047
20	H5 I2S	4,836	DMMA	1,320
	H1 G	4,628	TSP	0,069
	H6 ANS6S	4,344		

25 La cuantificación de las señales características y bien diferenciadas de dalteparina sódica (generalmente aquellas correspondientes a los protones anoméricos, H1) se muestran en la siguiente tabla con los valores de proporción relativa observados para una serie de seis muestras de dalteparina sódica:

	Señal	Desplazamiento químico, ppm	Proporción relativa, %
30	H1 ANS6S	5,40	25,5-25,8
	H1 I2S	5,23	19,2-20,8
	H1 I2S-(AM.ol)	5,18	9,5-9,8

H2 ANS	3,29	28,0-30,0
NAc	2,05	15,4-20,0

EJEMPLO 6

5

La misma solución empleada en el ejemplo 5, se utiliza para la realización del estudio por ^1H - ^{13}C HSQC. Las principales señales identificadas son las siguientes:

	Señal	$\delta^{13}\text{C}$, ppm	$\delta^1\text{H}$, ppm	Señal	$\delta^{13}\text{C}$, ppm	$\delta^1\text{H}$, ppm
10	C1-H1 G // Gal	106,62	4,66	C4-H4 ANS6S(-G)	80,94	3,84
	C1-H1 Xyl	105,79	4,45	C2-H2 I2S	78,53	4,34
	C1-H1 G(-ANAc)	105,13	4,50	C3-H3 Xyl	77,82	3,72
	C1-H1 I(-A6S)	104,94	5,01	C2-H2 G(-AN6S)	75,70	3,40
	C1-H1 G(-ANS)	104,77	4,60	C3-H3 ANS6S (-G)	72,47	3,66
15	C1-H1 I(-A6OH)	104,67	4,94	C5-H5 I2S	72,01	4,83
	C1-H1 G (-ANS3S)	103,91	4,61	C3-H3 I2S	71,87	4,21
	C1-H1 G2S	102,99	4,75	C5-H5 ANS6S(-G)	71,72	4,09
	C1-H1 I2S	102,09	5,22	C5-H5 Xyl	65,89	4,12
	C1-H1 ANS(-G)	100,50	5,58	C5-H5 Xyl	65,86	3,40
20	C1-H1 ANAc	100,23	5,31	C6-H6 Gal	63,90	3,74
	C1-H1 ANS(-I2S)	99,78	5,40	AM.ol-6S	63,8/63,7	3,70/3,74
	C1-H1 ANS6S	99,43	5,43	C2-H2 ANS(-I2S)	60,82	3,28
	C1-H1 ANS,3S	99,06	5,51	C2-H2 ANS6S(-G)	60,52	3,29
	C1-H1 ANS(-I)	98,42	5,34	C2-H2 ANAc	56,68	3,92
25	C3-H3 Gal	85,45	3,78	DMMA	26,73	1,32
	C3-H3 Gal	84,85	3,83	NAc	24,87	2,05

Estas señales se pueden asociar a componentes monosacáridos de la molécula, de modo que la cuantificación de estas permite la determinación de su composición monosacárida.

30

Las integrales para cada una de estas señales fueron normalizadas a partir del valor fijado para la integral del DMMA, usando el mismo procedimiento explicado para los experimentos

¹H RMN. La cuantificación de las señales características de dalteparina sódica se muestra en la siguiente tabla:

	Señal	Proporción relativa, %
5	C1-H1 ANS-I2S	22,2-23,3
	C1-H1 ANS-I	3,0-3,2
	C1-H1 ANS-G	2,3-2,6
	C1-H1 ANS.3S	2,1-2,9
	C1-H1 ANAc	2,4-3,1
10	C1-H1 I2S	24,5-27,5
	C1-H1 I-A6S	3,6-4,0
	C1-H1 G-ANS,3S	1,8-2,3
	C1-H1 G-ANS	2,5-3,5
	C1-H1, C6-H6 AM.ol-6S	20,8-21,7

15

EJEMPLO 7

Estudio por ¹H RMN de tinzaparina sódica.

20 Las principales señales identificadas son las siguientes:

	Señal	Desplazamiento químico, ppm	Señal	Desplazamiento químico, ppm
25	H4 ΔU2S	5,992	H6 ANS6S	4,344
	H4 ΔU	5,825	H6' ANS6S	4,210
	H1 ANS(-G)	5,585	H3 ANS	3,670
	H1 ΔU2S	5,509	H2 ANS3S	3,395
	H1 ANS6S	5,405	H2 ANS	3,293
30	H1 I2S	5,228	NAc	2,047
	H1 I	5,012	DMMA	1,320
	H5 I2S	4,836	TSP	0,069

H1 G 4,628

La cuantificación de las señales características y bien diferenciadas de tinzaparina sódica (generalmente aquellas correspondientes a los protones anoméricos, H1) se muestran en la siguiente tabla con los valores de proporción relativa observados para una serie de seis muestras de tinzaparina sódica:

Señal	Desplazamiento químico, ppm	Proporción relativa, %
H4 ΔU2S	5,99	2,7
H1 ΔU2S	5,51	5,3
H1 ANS6S	5,40	23,6
H1 I2S	5,23	21,0
H2 ANS	3,29	30,0
NAc	2,05	16,1

EJEMPLO 8

La misma solución empleada en el ejemplo 7, se utiliza para la realización del estudio por ¹H-¹³C HSQC. Las principales señales identificadas son las siguientes:

Señal	δ ¹³ C, ppm	δ ¹ H, ppm	Señal	δ ¹³ C, ppm	δ ¹ H, ppm
C4-H4 ΔU	110,71	5,82	C3-H3 Gal	85,45	3,78
C4-H4 ΔU2S	108,97	5,99	C3-H3 Gal	84,85	3,83
C1-H1 G // Gal	106,62	4,66	C4-H4 ANS6S(-G)//80,94		3,84
			ANS6S red		
C1-H1 Xyl	105,79	4,45	C2-H2 I2S	78,53	4,34
C1-H1 G(-ANAc)	105,13	4,50	C3-H3 Xyl	77,82	3,72
C1-H1 I(-A6S)	104,94	5,01	C2-H2 ΔU2S	77,42	4,62
C1-H1 G(-ANS)	104,77	4,60	C2-H2 G(-AN6S)	75,70	3,40
C1-H1 I(-A6OH)	104,67	4,94	C3-H3 ANS6S (-G)	72,47	3,66
C1-H1 Gal	104,30	4,54	C3-H3 ANS6S red	72,29	3,77
C1-H1 G (-ANS3S)	103,91	4,61	C5-H5 I2S	72,01	4,83

	C1-H1 Δ U	103,88	5,16	C3-H3 I2S	71,87	4,21
	C1-H1 G2S	102,99	4,75	C5-H5 ANS6S(-G)	71,72	4,09
	C1-H1 I2S	102,09	5,22	C5-H5 ANS6S red	70,64	4,12
	C1-H1 ANS(-G)	100,50	5,58	C5-H5 Xyl	65,89	4,12
5	C1-H1 ANAc	100,23	5,31	C5-H5 Xyl	65,86	3,40
	C1-H1 Δ U2S	100,18	5,51	C3-H3 Δ U2S	65,75	4,32
	C1-H1 ANS(-I2S)	99,78	5,40	C6-H6 Gal	63,90	3,74
	C1-H1 ANS6S	99,43	5,43	C2-H2 ANS6S red// ANS(-I2S)	60,82	3,28
10	C1-H1 ANS,3S	99,06	5,51	C2-H2 ANS6S(-G)	60,52	3,29
	C1-H1 ANS β red	98,73	4,71	C2-H2 MNS6S red	60,38	3,60
	C1-H1 ANS(-I)	98,42	5,34	C2-H2 ANAc	56,68	3,92
	C1-H1 I2S α red	95,70	5,42	DMMA	26,73	1,32
	C1-H1 I2S β red	94,76	4,97	NAc	24,87	2,05
15	C1-H1 ANS α red// ANS6S red	93,97	5,45			

Estas señales se pueden asociar a componentes monosacarídicos de la molécula, de modo que la cuantificación de éstas permite la determinación de su composición monosacarídica.

20

Las integrales para cada una de estas señales fueron normalizadas a partir del valor fijado para la integral del DMMA, usando el mismo procedimiento explicado para los experimentos ^1H RMN. La cuantificación de las señales características de tinzaparina sódica se muestra en la siguiente tabla:

25

Señal	Proporción relativa, %
C1-H1 ANS-I2S	27,2
C1-H1 ANS-I	3,2
C1-H1 ANS-G	3,4
30 C1-H1 ANS,3S	1,2
C1-H1 ANAc	3,7
C1-H1 ANAc- α red	< LC

	C1-H1 ANS-red	6,5
	C1-H1 I2S	35,1
	C1-H1 I-A6S	3,1
	C1-H1 I-A6OH	0,8
5	C1-H1 G-ANS,3S	1,5
	C1-H1 G-ANS	3,4
	C1-H1 G-ANAc	2,2
	C1-H1 Δ U2S	8,6
	C1-H1 I2S-red	<0,1

10

Estos experimentos demuestran que, utilizando las condiciones experimentales descritas en lo que antecede, es posible obtener un método de análisis por resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^1H - ^{13}C HSQC) de glicosaminoglicanos en general, y de heparinas y heparinas de bajo peso molecular y sus derivados en particular, que permite su análisis cuantitativo.