

(11) Número de Publicação: **PT 2314632 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07H 3/06** (2013.01) **C08B 37/00** (2013.01)  
**C12Q 1/527** (2013.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2005.03.22**

(30) Prioridade(s): **2004.03.24 EP 04290791**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.04.27**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.01.23**  
**074/2013**

(73) Titular(es):

**AVENTIS PHARMA S.A.**  
**20, AVENUE RAYMOND ARON F-92160 ANTONY**  
**FR**

(72) Inventor(es):

**PIERRE MOURIER** **FR**  
**CHRISTIAN VISKOV** **FR**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO**  
**RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS OLIGOSSACARÍDICOS DERIVADOS DE HEPARINA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO PARA OXIDAR HEPARINAS NÃO FRACCIONADAS, A UM MÉTODO PARA DETERMINAR O TEOR DE GLICOSERINA DE UMA AMOSTRA DE UMA HEPARINA OU DE UM PRODUTO DE HEPARINA, COMPREENDENDO DESPOLIMERIZAR A AMOSTRA COM, PELO MENOS, UMA HEPARINASE E ANALISAR A AMOSTRA UTILIZANDO UM PROCESSO CROMATOGRÁFICO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE GLICOSERINA E/OU DE RESÍDUOS OXIDADOS DE GLICOSERINA NA AMOSTRA, ASSIM COMO A COMPOSTOS OLIGOSSACARÍDICOS OBTIDOS POR ESTE PROCESSO.

**RESUMO**

**"COMPOSTOS OLIGOSSACARÍDICOS DERIVADOS DE HEPARINA"**

A invenção refere-se a um processo para oxidar heparinas não fraccionadas, a um método para determinar o teor de glicosserina de uma amostra de uma heparina ou de um produto de heparina, compreendendo despolimerizar a amostra com, pelo menos, uma heparinase e analisar a amostra utilizando um processo cromatográfico para detectar a presença ou ausência de glicosserina e/ou de resíduos oxidados de glicosserina na amostra, assim como a compostos oligossacarídicos obtidos por este processo.

## DESCRIÇÃO

### "COMPOSTOS OLIGOSSACARÍDICOS DERIVADOS DE HEPARINA"

É aqui descrito um processo para oxidar preparações em bruto de heparina utilizando, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário. As preparações de heparina resultantes estão relativamente livres de resíduos de glicosserina e são úteis, por exemplo, para preparar heparinas de baixo peso molecular (LMWH) e heparinas de ultra-baixo peso molecular (ULMWH) que estão relativamente livres de resíduos de glicosserina. É também aqui descrito um método para detectar a presença de glicosserina e de derivados de glicosserina em preparações de heparina e de heparina fragmentada.

Os heparinas são membros biologicamente activos da família dos glicosaminoglicanos e podem ser extraídas a partir de, *e. g.*, fontes bovinas e porcinas. As heparinas têm propriedades anticoagulantes e antitrombóticas que as tornam úteis no tratamento de tromboses, tais como tromboses arteriais e venosas. Quando isoladas, as moléculas de heparina natural têm uma elevada actividade anticoagulante, o que pode conduzir a hemorragias. Além disso, as moléculas de heparina são sensíveis a factores séricos particulares e, consequentemente, devem ser administrados em doses grandes para proporcionar benefícios antitrombóticos, aumentando muito o risco de hemorragias.

Os fragmentos de LMWH podem ser preparados por vários processos a partir de heparina: fraccionamento por meio de

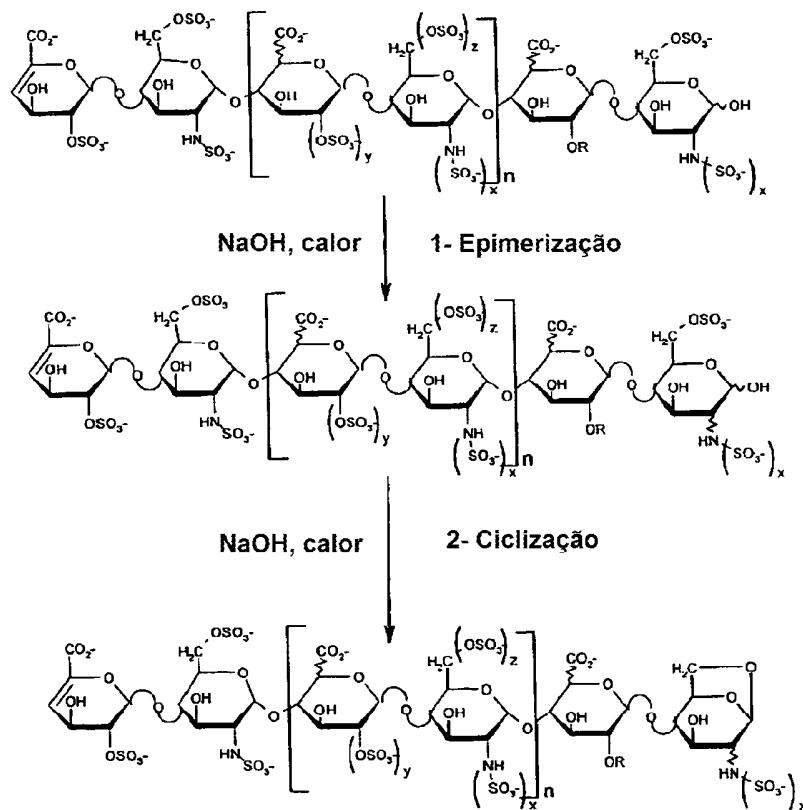
solventes (Documento FR 2440376, Pat. U.S. Nº 4692435); fraccionamento numa resina aniónica (documento FR 2453875); filtração em gel (Barrowcliffe, Thromb. Res. 12, 27-36 (1977)); cromatografia de afinidade (Pat. U.S. Nº 4401758); despolimerização controlada por meio de agente químico incluindo, mas não limitado a ácido nitroso (documentos EP 14184, EP 37319, EP 76279, EP 623629, FR 2503714, Pat. U.S. Nº 4804652; WO 813276), beta-eliminação a partir de um éster de heparina (documento EP 40144, Pat. U.S. Nº 5389618), periodato (documento EP 287477), boro-hidreto de sódio (documentos EP 347588, EP 380943), ácido ascórbico (Pat. U.S. Nº 4533549), peróxido de hidrogénio (Pat. U.S. Nº 4629699, Pat. U.S. Nº 4791195), hidróxido de amónio quaternário a partir de um sal de amónio quaternário de heparina (Pat. U.S. Nº 4981955), hidróxido de metal alcalino (documentos EP 380943, EP 347588), através de uma via enzimática (documentos EP 64452, Pat. U.S. Nº 4396762, EP 244235, EP 244236; Pat. U.S. Nº 4826827; Pat. U.S. Nº 3766167) ou por meio de irradiação (documento EP 269981). Ver também Patente U.S. Nº 4303651 e Patente U.S. Nº 4757057. Foi reportado que as misturas de LMWH resultantes demonstram uma actividade antitrombótica mais elevada, devido à actividade anti-factor Xa (aXa) elevada e a uma actividade anti-factor IIa (aIIa) mais baixa do que heparina não fraccionada, e são frequentemente misturas mais desejáveis para administração a um doente com necessidade de tratamento para tromboses.

Cada fabricante de LMWH de um produto aprovado utiliza um processo distinto de despolimerização. A menos que dois fabricantes utilizem o mesmo processo, esta diferença de processos resulta em LMWH com estruturas químicas distintas e, deste modo, actividades farmacológicas diferentes e indicações aprovadas diferentes para utilização clínica.

Deste modo, as LMWH são estruturalmente diferenciadas pelos processos de despolimerização utilizados para o seu fabrico (R.J. Linhardt, et al., Seminars in Thombosis and Hemostatis 1999; 25(Supl.3): 5-16). Como resultado, as LMWH são mais heterogéneas do que a heparina. Cada processo diferente provoca modificações estruturais únicas e altamente complexas às cadeias polisacarídicas. Estas modificações incluem diferenças nos comprimentos da cadeia e nas sequências da cadeia, assim como nos aspectos estruturais distintivos. Consequentemente, cada uma das LMWH comercialmente diferentes têm perfis farmacológicos distintivos e indicações clínicas aprovadas diferentes.

Durante o processo para preparar enoxaparina sódica, vendida sob a marca registada Lovenox® nos E.U.A. e Clexane® noutrios países, a partir de heparina pura, o processo de despolimerização alcalina de fase aquosa produz uma conversão parcial, mas característica, das glucosaminas das extremidades redutoras das cadeias oligossacarídicas.

O primeiro passo desta conversão consiste numa epimerização glucosamina ↔ manosamina (T. Toida, et al., J. Carbohydrate Chemistry, 15(3), 351-360 (1996)); o segundo passo é uma 6-O-dessulfatação da glucosamina, conduzindo à formação de derivados denominados "1,6-anidro" (Pedido de Patente Internacional WO 01/29055).



Este tipo de derivado é obtido para cadeias oligossacarídicas cujo terminal de glucosamina é 6-O-sulfatado.

A percentagem de cadeias oligossacarídicas cuja extremidade é modificada com uma ligação 1,6-anidra é uma característica estrutural da mistura de oligossacáridos de enoxaparina sódica Lovenox®. Com base no conhecimento actual, entre 15% e 25% dos componentes de Lovenox® (enoxaparina sódica) têm uma estrutura 1,6-anidra na extremidade redutora da sua cadeia.

Recentemente, novos processos para a preparação de fragmentos de heparina que utilizam despolimerização na presença de uma base forte, produziram heparinas de ultra-baixo peso molecular que têm um peso molecular médio que varia desde aproximadamente 1500 a aproximadamente 3000 Daltons (ULMWH),

como descrito, e.g., no Pedido de Patente Publicado U.S. Nº 2002-0055621 A1, aqui especificamente incorporado por referência.

As composições de fragmentos de LMWH e ULMWH são heterogéneas e contêm fragmentos individuais de heparina de comprimentos e pesos moleculares variáveis.

As misturas da própria heparina e de fragmentos de heparina limitaram a estabilidade em armazenamento, pelo menos em parte, porque se tornaram coradas durante o armazenamento. Uma vez que desenvolvem cor, essas composições não podem ser comercialmente desejáveis para injecção em doentes. Um processo que produz heparina que resiste à coloração é, deste modo, altamente desejável por razões comerciais. Essa heparina resistente à coloração pode, naturalmente, ser utilizada para preparar LMWH e/ou ULMWH resistentes à coloração através de métodos conhecidos dos especialistas na técnica. Além disso, um método para avaliar o potencial de preparações de heparina para corarem seria útil no fabrico de heparina, LMWH e ULMWH.

O documento U.S. 3135660 descreve um processo de purificação de hidratos de carbono sulfatados com agentes oxidantes. O documento U.S. 3174904 descreve um processo de descorar hidratos de carbono sulfatados e o documento GB 766992 refere-se a um processo de preparação de heparina descorada.

Um processo para preparar heparina que é resistente à coloração é aqui descrito. A heparina resultante pode subsequentemente ser utilizada para produzir misturas de LMWH e ULMWH, particularmente misturas comercialmente disponíveis, tais como fraxiparina, fragmina, innohep (ou logiparina), normiflo, embolex (ou sandoparina), fluxum (ou minidalton), clivarina e

hibor, que são resistentes à coloração. Pode ser utilizada enoxaparina, vendida comercialmente como Lovenox® (enoxaparina sódica) nos E.U.A. e Clexane® (enoxaparina sódica) noutras países. A enoxaparina está comercialmente disponível da Aventis Pharma S.A. e Aventis Pharmaceuticals, Inc. É também descrito um método para monitorização da tendência da heparina e das misturas de fragmentos de heparina para corar.

É descrito um processo para preparar heparina que utiliza, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, tal como permanganato de potássio, num processo de oxidação de heparina para produzir composições heparínicas sem glicosserina. Esse processo é descrito abaixo. É aqui descrito que se, pelo menos, um desses sais de permanganato, tal como permanganato de potássio, for utilizado no passo de oxidação, pode ser obtida heparina sem glicosserina ou de baixa glicosserina. Foi também descrito que a remoção dos resíduos de glicosserina e/ou dos derivados de glicosserina a partir da heparina pode conduzir a produtos com características comerciais melhoradas. Esses produtos de reduzida glicosserina são incolores ou quase incolores e mostram uma tendência diminuída para corar relativamente a produtos feitos com heparina que não foi oxidada na presença de permanganato de potássio. Além disso, é também descrito um método para detectar resíduos de glicosserina (ou a sua falta) em composições de heparina. Este método inclui o pré-tratamento da heparina com uma ou mais heparinases e detecção dos grupos acetilados utilizando cromatografia. Descrições detalhadas adicionais são proporcionadas abaixo.

São proporcionadas condições que permitem a eliminação quimiosselectiva de resíduos de glicosserina e de derivados de

glicosserina, tal como glicosserinas oxidadas, a partir da heparina.

É descrito que, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, tal como permanganato de potássio, é utilizado num processo de oxidação de heparina compreendendo oxidação com cerca de 4% a cerca de 10% em peso relativamente à heparina do referido, pelo menos um, sal de permanganato para obter uma heparina sem glicosserina ou de baixa glicosserina. Se a heparina sem glicosserina ou de baixa glicosserina resultante for despolimerizada utilizando métodos conhecidos na técnica, podem ser obtidas as LMWH ou ULMWH sem glicosserina ou de baixa glicosserina, tais como, fraxiparina, fragmina, innohep (ou logiparina), normiflo, embolex (ou sandoparina), fluxum (ou minidalton), clivarina e hibor, mas não enoxaparina sódica. Pensa-se, contudo, que os processos comerciais para fabrico desses produtos comerciais contêm detalhes exclusivos que, pelo menos no caso da enoxaparina, podem afectar as propriedades biológicas do produto final, como explicado em 19 de Fevereiro de 2003, na Citizen Petition and Citizen Petition Supplement (03P-0064/CP1) apresentada em nome da Aventis Pharmaceuticals Inc., uma subsidiária da Aventis SA, a cessionária e publicamente disponível a partir da United States Food and Drug Administration (USFDA).

A descrição também se refere a um processo para preparar, pelo menos, um produto decorado de heparina escolhido de fraxiparina, fragmina, innohep (logiparina), normiflo, embolex (sandoparina), fluxum (minidalton), clivarina e hibor a partir de heparina compreendendo:

a) purificação de heparina por oxidação com cerca de 4% a cerca de 10% em peso relativamente à heparina de, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, em que a oxidação ocorre a uma temperatura que varia desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C; e

b) despolimerização por um fabricante da heparina oxidada de acordo com um processo para obter o referido produto de heparina.

Alternativamente, o fabricante pode despolimerizar a heparina oxidada com cerca de 4% a cerca de 10% em peso relativamente à heparina de, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, em que a oxidação ocorre a uma temperatura que varia desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C de acordo com um processo para obter o referido produto de heparina.

Em geral e não necessariamente relativo a processos comerciais, os métodos adequados para despolimerização são divulgados, por exemplo, nos documentos FR 2440376, Pat. U.S. Nº 4692435, FR 2453875, Barrowcliffe, Thromb. Res. 12, 27-36 (1977), Pat. U.S. Nº 4401758, EP 14184, EP 37319, EP 76279, EP 623629, FR 2503714, Pat. U.S. Nº 4804652, WO 813276, EP 40144, Pat. U.S. Nº 5389618, EP 287477, EP 347588, EP 380943, Pat. U.S. Nº 4533549, Pat. U.S. Nº 4629699, Pat. U.S. Nº 4791195, Pat. U.S. Nº 4981955, EP 380943, EP 347588, EP 64452, Pat. U.S. Nº 4396762, EP 244235, EP 244236, Pat. U.S. Nº 4826827, Pat. U.S. Nº 3766167, EP 269981, Patente U.S. Nº 4303651, Patente U.S. Nº 4757057 e Pedido publicado de Patente U.S. Nº 2002-0055621 A1, todos os quais são

aqui incorporados pela divulgação de tais métodos, a não ser a Pat. U.S. N° 5389618 que é apenas incorporada como presentemente emendada no processo de concessão após oposição.

A utilização de, pelo menos, um sal de permanganato, tal como permanganato de potássio, é também descrito no processo de oxidação de heparina descrito acima, *i. e.*, oxidação com cerca de 4% a cerca de 10% em peso relativamente à referida heparina de, pelo menos, o referido sal de permanganato para obter uma heparina que seja descorada. Se a heparina descorada resultante for despolimerizada, podem ser obtidos produtos de heparina descorada incluindo LMWH ou ULMWH, tais como fraxiparina, fragmina, innohep (ou togiparina), normiflo, embolex (ou sandoparina), fluxum (ou minidalton), clivarina e hibor, sujeitos aos comentários realizados acima nos processos comerciais.

A utilização de permanganato de potássio no processo de oxidação de heparina, descrito acima, para obter uma heparina que é de baixa glicosserina ou sem glicosserina e descorada é também aqui descrita. Se a heparina de baixa glicosserina ou sem glicosserina e descorada resultante for despolimerizada, podem ser obtidos produtos de heparina descorada incluindo LMWH ou ULMWH, tais como fraxiparina, fragmina, innohep (ou logiparina), normiflo, embolex (ou sandoparina), fluxum (ou minidalton), clivarina e hibor, como acima explicado.

Na descrição, o termo "heparina" significa todas as formas de heparina à excepção de um produto de heparina, incluindo sem limitação, heparina em bruto, heparina melhorada e heparina purificada.

Na descrição, a expressão "heparina melhorada" significa heparina tendo uma actividade anti-Xa aumentada comparativamente à heparina inicial antes do melhoramento. Por exemplo e sem limitação, se a actividade anti-Xa da heparina inicial for 140 IU/mg, a heparina melhorada pode ter uma actividade anti-Xa de 150 IU/mg ou 200 IU/mg.

Na descrição, a expressão "heparina de baixo peso molecular" ou "LMWH" significa uma mistura de polissacáridos obtidos a partir de heparina e que têm um peso molecular médio maior do que aproximadamente 3000 Daltons e menor do que aproximadamente 10000 Daltons.

Na descrição, a expressão "heparina de ultra-baixo peso molecular" ou o termo "ULMWH" significa uma mistura de polissacáridos obtidos a partir de heparina que têm um peso molecular médio que varia desde aproximadamente 1500 a aproximadamente 3000 Daltons.

Na descrição, o termo "despolimerização" (e as suas variações tais como despolimeriza ou despolimerizar) incluem todos os tipos de despolimerização, incluindo sem limitação, fragmentação, despolimerização química e enzimática e outros métodos de preparar fragmentos de heparina, incluindo sem limitação, fraccionamento.

Na descrição, a expressão "baixa glicosserina" significa uma percentagem de glicosserina (tal como, por exemplo, ilustrado abaixo no parágrafo 59) menor ou igual a 0,3% de todos os resíduos de dissacárido na amostra que têm uma glicosserina ligada.

Na descrição, a expressão "sem glicosserina" significa uma percentagem de glicosserina (tal como, por exemplo, ilustrado abaixo no parágrafo 59) menor ou igual a 0,1% de todos os resíduos de dissacárido na amostra que têm uma glicosserina ligada.

Na descrição, a expressão "relativamente sem glicosserina" significa uma percentagem de glicosserina (tal como, por exemplo, ilustrado abaixo no parágrafo 59) menor ou igual a 0,3% de todos os resíduos de dissacárido na amostra que têm uma glicosserina ligada.

Na descrição, o termo "descorada" significa menor ou igual a 0,2 unidades de absorvência num teste de estabilidade acelerada, tal como aquele descrito abaixo sob o título "Preparação para análise colorimétrica da amostra". A Figura 1 reflecte o resultado de um teste de estabilidade acelerada para enoxaparina sódica.

Na descrição, o termo "coloração" significa mais do que 0,2 unidades de absorvência num teste de estabilidade acelerada, tal como aquele descrito abaixo sob o título "Preparação para análise colorimétrica da amostra". A Figura 1 reflecte o resultado de um teste de estabilidade acelerada para enoxaparina sódica.

Na descrição, a expressão "resistente à coloração" significa menor ou igual a 0,2 unidades de absorvência num teste de estabilidade acelerada, tal como aquele descrito abaixo sob o título "Preparação para análise colorimétrica da amostra". A Figura 1 reflecte o resultado de um teste de estabilidade acelerada para enoxaparina sódica.

Na descrição, a expressão "produto de heparina" significa LMWH e ULMWH.

É aqui descrito que 4 a 10% em peso relativamente à heparina de, pelo menos, um permanganato escolhido a partir de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, tal como permanganato de potássio, é utilizado para preparar heparinas purificadas por oxidação. Aproximadamente 8% em peso relativamente à heparina de permanganato de potássio pode ser utilizado num processo para preparar heparinas purificadas por oxidação.

É aqui descrito que o processo para preparar heparinas purificadas por oxidação com, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, tal como permanganato de potássio, é realizado a uma temperatura que varia desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C. O processo para preparar heparinas purificadas por oxidação com permanganato de potássio pode ser realizado a uma temperatura desde aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C.

É também descrita, pelo menos uma composição escolhida de LMWH e ULMWH de baixa glicosserina, sem glicosserina e descorada, exclusivas de produtos aprovados pela USFDA desde a data de apresentação deste pedido, em que a referida composição pode ser obtida de acordo com um processo compreendendo os seguintes passos:

a) purificação da heparina por acção de 4 a 10% em peso relativamente à heparina de, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, tal como permanganato de

potássio, em que a oxidação ocorre a uma temperatura que varia desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C;

- b) despolimerização da heparina; e
- c) opcionalmente, purificação da, pelo menos uma, composição.

É descrita, pelo menos, uma composição escolhida de LMWH e ULMWH de baixa glicosserina, sem glicosserina e descorada, exclusivas de produtos aprovados pela USFDA desde a data de apresentação deste pedido, a qual pode ser obtida de acordo com um processo compreendendo heparina despolimerizada oxidada por acção de 4 a 10% em peso relativamente à heparina de, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, em que a oxidação ocorre a uma temperatura que varia desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C.

Adicionalmente, é também descrito um método para determinar o teor de glicosserina de uma amostra de uma heparina ou de um produto de heparina, incluindo, mas não limitado a, LMWH e ULMWH e as suas formas comercialmente disponíveis, o referido método compreendendo:

- a) tratar uma amostra escolhida de heparinas e produtos de heparina; e
- b) posteriormente, utilizar um processo de cromatografia para determinar a presença de resíduos de glicosserina na amostra.

A amostra escolhida de heparinas e produtos de heparina pode ser tratada por despolimerização através da acção de uma heparinase antes de ser analisada no processo de cromatografia.

A amostra escolhida de heparinas e produtos de heparina pode ser despolimerizada por acção de uma mistura de heparinases. Por exemplo, a mistura de heparinases pode compreender heparinase 1 (EC 4.2.2.7.), heparinase 2 (heparina liase II) e heparinase 3 (EC 4.2.2.8.). A cromatografia de permuta aniónica (SAX - permuta aniónica forte) pode ser utilizada para determinar a presença (ou ausência) de glicosserina na amostra após a amostra ser tratada. A fase estacionária para a cromatografia de permuta aniónica pode ser ligada com derivados de amónio quaternário, incluindo, por exemplo,  $-\text{NMe}_3^+$ . Como aqui utilizada, a expressão "cromatografia de permuta aniónica forte" (SAX) inclui chromatografia de permuta aniónica conduzida em qualquer resina que mantenha uma carga total positiva constante na gama de cerca de pH 2-12. A chromatografia de permuta aniónica forte pode utilizar um suporte sólido funcionalizado com grupos permutadores de amónio quaternário. Por exemplo, podem ser utilizadas colunas, tal como Spherisorb® SAX (Waters Corp, Milford MA) que têm um tamanho de partícula de cerca de 5  $\mu\text{m}$ , um comprimento de coluna de cerca de 25 cm e um diâmetro de coluna entre cerca de 1 mm e cerca de 4,6 mm. A chromatografia de CTA-SAX pode ser utilizada, como descrita no Pedido de Patente U.S. intitulado "Método para a Determinação de Grupos Específicos Constituintes de Heparinas ou de Heparinas de Baixo Peso Molecular" apresentado no USPTO com a mesma data do presente pedido e aqui incorporado por referência apenas para referências à chromatografia de CTA-SAX. A chromatografia de CTA-SAX é definida no referido pedido como chromatografia de permuta aniónica conduzida num sal de amónio quaternário revestido dinamicamente numa coluna de sílica de fase inversa que mantém uma carga total positiva constante na gama de cerca de pH 2 a cerca de pH 12.

Um método para quantificar o teor de glicosserina de uma amostra de uma heparina ou de um produto de heparina que por análise da amostra para o teor de glicosserina é aqui descrito. A análise da amostra pode incluir digerir enzimaticamente a amostra e quantificar o teor dos resíduos de glicosserina na amostra digerida por métodos cromatográficos, tal como HPLC. A CTA-SAX ou SAX pode ser utilizada para quantificar o teor de resíduos de glicosserina. Por exemplo e sem limitação, o teor de glicosserina da amostra pode ser reduzido abaixo de 2,0% da amostra, abaixo de 0,3% da amostra ou abaixo de 0,1% da amostra. O teor de glicosserina da amostra também pode ser 0,0% (*i. e.*, indetectável).

É descrito que no método para determinar o teor de glicosserina de uma amostra de uma heparina ou de um produto de heparina, a fase móvel para o passo de cromatografia é transparente à luz ultravioleta (UV) numa gama desde cerca de 200 nm numa a cerca de 400 nm. A fase móvel pode compreender, por exemplo, perclorato de sódio, sais de metanossulfonato ou sais de fosfato. O método para determinar o teor pós-tratamento de glicosserina de uma amostra escolhida de heparinas e produtos de heparina, os polissacáridos podem ser detectados pela sua absorção UV após cromatografia. A absorção UV dos polissacáridos pode ser medida a dois comprimentos de onda, por exemplo, 202 nm e 240 nm, após cromatografia de modo que os sinais de absorção de polissacáridos não acetilados se cancelam.

É também descrito um método para monitorização do teor de glicosserina de uma amostra de uma heparina ou de um produto de heparina, o referido método compreendendo:

- a) remover e/ou diminuir a glicosserina e/ou resíduos oxidados de glicosserina da amostra; e

b) analisar a amostra utilizando um processo cromatográfico para detectar a presença ou ausência de glicosserina e/ou de resíduos oxidados de glicosserina na amostra.

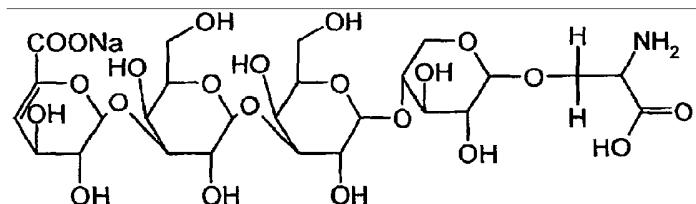
Remover e/ou diminuir a glicosserina e/ou os resíduos oxidados de glicosserina pode compreender

- a) purificação da heparina por oxidação com cerca de 4% a cerca de 10% em peso relativamente à heparina de, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, em que a oxidação ocorre a uma temperatura que varia desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C.; e
- b) despolimerização da heparina oxidada.

O teor de glicosserina de uma amostra escolhida de heparinas e produtos de heparina pode ser quantificado, por exemplo, por calibração externa ou calibração interna. A calibração interna pode compreender a utilização de um padrão interno, tal como ácido 2-naftol-3,6-dissulfónico. Noutra forma de realização relacionada, a solução a ser testada pode conter cerca de 0,15 g/L de ácido 2-naftol-3,6-dissulfónico.

É também descrito um método para prever a tendência de uma heparina ou de um produto de heparina para corar, o qual compreende medir o teor de glicosserina da referida heparina ou produto de heparina. O teor de glicosserina pode ser quantificado por calibração externa ou interna. A calibração interna pode compreender a utilização de um padrão interno. O padrão interno pode ser ácido 2-naftol-3,6-dissulfónico ou cerca de 0,15 g/L de ácido 2-naftol-3,6-dissulfónico.

O passo de cromatografia pode detectar o tetrassacárido do domínio de ligação de glicosserina de moléculas de heparina. O tetrassacárido do domínio de ligação de glicosserina de heparina é:



Um especialista na técnica entenderá que este método e os aspectos aqui descritos podem ser utilizados para determinar o teor de glicosserina de LMWH e ULMWH conhecidos na técnica, assim como aqueles disponíveis comercialmente.

Os desenhos anexos que são incorporados nesta descrição são agora descritos.

A Figura 1 ilustra os testes de estabilidade acelerada de enoxaparina sódica não tratada com permanganato e tratada com permanganato, comercialmente disponíveis como descrito acima.

A Figura 2 é um cromatograma representativo de um material de heparina despolimerizada.

A Figura 3 é um espectro de UV que ilustra um método para a detecção selectiva de açúcares acetilados.

A RMN do tetrassacárido GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser (pico nº1) mostra um espectro em  $D_2O$ , 500 MHz ( $\delta$  em ppm) como se segue: 3,30 (1H, t, 7 Hz), 3,34 (1H, t, 8 Hz), 3,55 (1H, t, 7 Hz), 3,60 (1H, t, 7 Hz), entre 3,63 e 3,85 (10H, pico não resolvido), 3,91 (2H, pico não resolvido), 3,96 (1H, dd, 7 e 2 Hz), entre 4,02 e 4,10 (3H, pico não resolvido), 4,12 (1H, d, 2 Hz), 4,18 (1H, pico não resolvido).

resolvido), 4,40 (1H, d, 6 Hz), 4,46 (1H, d, 6 Hz), 4,61 (1H, d, 6 Hz), 5,29 (1H, d, 3 Hz), 5,85 (1H, d, 3 Hz).

A presença de resíduos de glicosserina em preparações de heparina, LMWH e ULMWH pode causar problemas de qualidade e estabilidade que diminuem o valor comercial do produto. Por exemplo, em testes de estabilidade de enoxaparina, os resíduos de glicosserina aumentam a taxa de coloração e podem conduzir a lotes do produto que não estão dentro das especificações de fabrico aprovadas. Ver Figura 1. O controlo da quantidade de glicosserina na heparina torna possível padronizar melhor os produtos comerciais resultantes, incluindo LMWH e ULMWH. Consequentemente, o risco de produzir lotes do produto que não podem ser vendidos pode ser diminuído.

Foi descrito que a acção de, pelo menos, um dos sais de permanganato aqui mencionados, tal como permanganato de potássio, torna possível clivar selectivamente o resíduo de glicosserina na cadeia de heparina. Além disso, foram caracterizados os locais de acção do permanganato, o mecanismo de acção do permanganato e as estruturas que resultam da acção do permanganato.

Consequentemente, são descritos uma heparina sem glicosserina, descorada, e um processo para preparar a heparina sem glicosserina, descorada, o referido processo compreendendo os seguintes passos:

a) tratamento da heparina com desde cerca de 4% a cerca de 10% relativamente ao peso de heparina de, pelo menos, um permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, tal como permanganato de potássio, a uma temperatura que varia desde

aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C de acordo com o processo como descrito acima; e

b) purificação da heparina sem glicosserina, descorada.

A temperatura pode variar desde cerca de 40 °C a cerca de 80 °C. Nesta gama, 8% relativamente ao peso de heparina do tratamento de permanganato pode manter a sua eficácia em eliminar resíduos de glicosserina. E a concentrações de permanganato iguais ou superiores a 4% relativamente ao peso da heparina de permanganato, a uma temperatura de aproximadamente 80 °C, o tratamento descrito pode virtualmente eliminar resíduos de glicosserina detectáveis. Abaixo de 4% relativamente ao peso da heparina de permanganato, o tratamento pode já não ser suficiente para eliminar resíduos de glicosserina (como mostrado no exemplo 9 abaixo). De facto, a concentração de permanganato de potássio utilizada no passo de oxidação é mais importante do que a temperatura na redução ou eliminação de resíduos de glicosserina.

A heparina preparada como descrito acima pode, por sua vez, ser utilizada para preparar outros produtos de heparina sem glicosserina e descorada, por exemplo, fraxiparina, enoxaparina, fragmina, innohep (ou logiparina), normiflo, embolex (ou sandoparina), fluxum (ou minidalton), clivarina e hibor.

É também descrito um processo para preparar enoxaparina descorada a partir de heparina, o referido processo compreendendo:

a) purificação da heparina por oxidação com cerca de 4% a cerca de 10% em peso relativamente à heparina de, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio,

permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, em que a oxidação ocorre a uma temperatura que varia desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C; e

b) despolimerização por um fabricante diferente de um escolhido por Aventis Pharma SA, pelas subsidiárias cuja propriedade é totalmente sua e os seus sucessores e cessionários e agentes da Aventis Pharma SA, as subsidiárias cuja propriedade é totalmente sua e os seus sucessores e cessionários, da heparina oxidada de acordo com um processo para obter a referida enoxaparina.

Adicionalmente, é descrito um processo para preparar enoxaparina descorada, o referido processo compreendendo:

despolimerização de acordo com um processo por um fabricante diferente de um escolhido de uma companhia da Aventis, os seus sucessores e cessionários e agentes de uma companhia da Aventis, seus sucessores e cessionários, de heparina oxidada em cerca de 4% a cerca de 10% em peso relativamente à heparina de, pelo menos, um sal de permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato de sódio e permanganato de amónio quaternário, em que a oxidação ocorre a uma temperatura que varia desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C, para obter a referida enoxaparina.

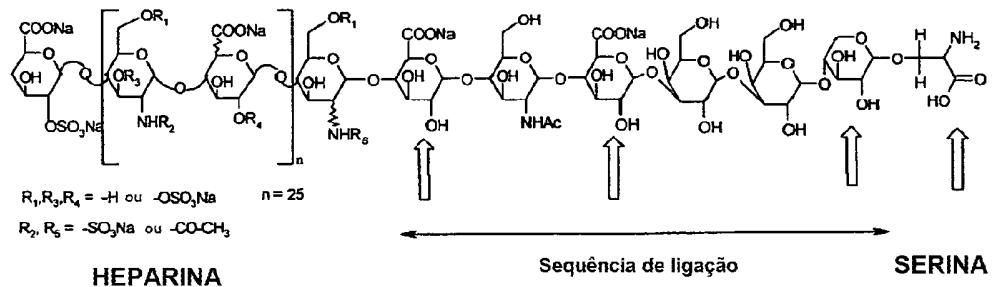
Adicionalmente, a heparina preparada como descrito acima pode, por sua vez, ser utilizada para preparar ULMWH sem glicosserina, descoradas. Os métodos para preparar LMWH e ULMWH são divulgados, por exemplo, nos documentos FR 2440376, Pat. U.S. N° 4692435, FR 2453875, Barrowcliffe, Thromb. Res. 12, 27-36 (1977), Pat. U.S. N° 4401758, EP 14184, EP 37319, EP 76279, EP 623629, FR 2503714, Pat. U.S. N° 4804652, WO 813276, EP 40144, Pat. U.S. N° 5389618, EP 287477, EP 347588,

EP 380943, Pat. U.S. N° 4533549, Pat. U.S. N° 4629699,  
Pat. U.S. N° 4791195, Pat. U.S. N° 4981955, EP 380943,  
EP 347588, EP 64452, Pat. U.S. N° 4396762, EP 244235, EP 244236,  
Pat. U.S. N° 4826827, Pat. U.S. N° 3766167, EP 269981,  
Patente U.S. N° 4303651, Patente U.S. N° 4757057 e Pedido  
Publicado de Patente U.S. N° 2002-0055621 A1, todos os quais são  
aqui incorporados pela sua divulgação de tais métodos, a não ser  
a Pat. U.S. N° 5389618 que é apenas incorporada como  
presentemente emendada no processo de concessão após oposição.

Deste modo, é descrito uma LMWH sem glicosserina, descorada  
e um processo para preparar LMWH sem glicosserina, descoradas,  
exclusivo de LMWH disponíveis reguladas pela USFDA desde a data  
de apresentação deste pedido, o referido processo compreendendo  
os seguintes passos:

- a) tratamento da heparina com desde cerca de 4% a cerca de 10%  
relativamente ao peso de heparina de, pelo menos, um  
permanganato escolhido de permanganato de potássio, permanganato  
de sódio e permanganato de amónio quaternário, tal como  
permanganato de potássio, a uma temperatura que varia desde  
aproximadamente 35 °C a aproximadamente 90 °C de acordo com o  
processo como descrito acima;
- b) purificação da heparina sem glicosserina, descorada; e
- c) despolimerização da heparina sem glicosserina, descorada,  
para produzir a referida LMWH sem glicosserina, descorada.

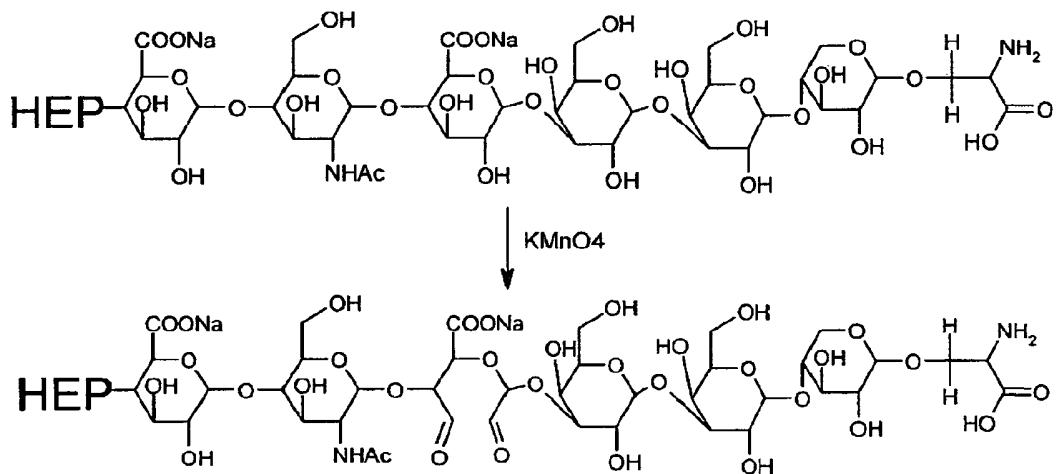
A estrutura abaixo mostra os pontos de clivagem do  
permanganato na heparina, demonstrando o mecanismo de ação do  
permanganato de potássio durante a oxidação das moléculas de  
heparina:



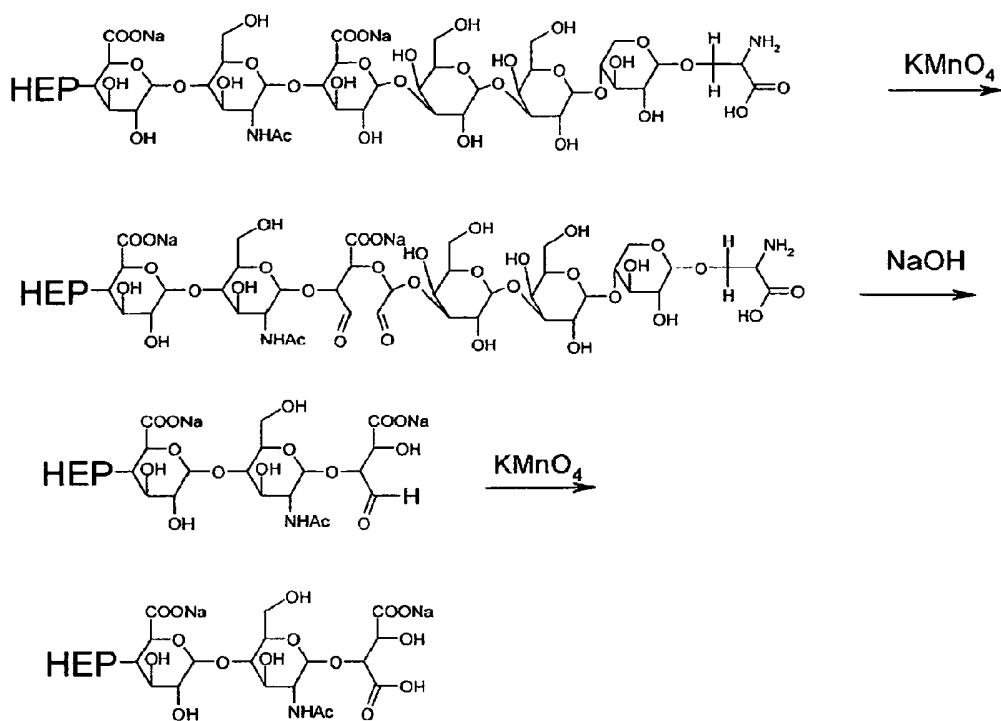
Sem se pretender estar limitado pela teoria, pensa-se que quando a heparina é tratada de acordo com o método, como descrito acima, o sal de permanganato actua em dióis vizinhos do ácido glucurónico, tornando possível eliminar selectivamente os resíduos de serina. Embora o permanganato de potássio seja muito mais selectivo, o periodato de sódio também cliva a heparina nestes locais (ver H. E. Conrad, Heparin-Binding Proteins, 130, Academic Press (1998)). Contudo, em contraste com reacções com permanganato, a reacção do periodato de sódio com heparina degrada o local ATIII e resulta numa perda indesejável de actividade anticoagulante. *Id.*

O tratamento com permanganato de potássio como descrito acima, degrada também o aminoácido glicosserina a um ácido, eliminando assim a fonte de um componente requerido para as reacções de coloração da heparina (reacções de Maillard). A acção do permanganato na heparina, de acordo com um método como descrito acima, pode ser ilustrada pelas seguintes reacções, as quais não são exaustivas:

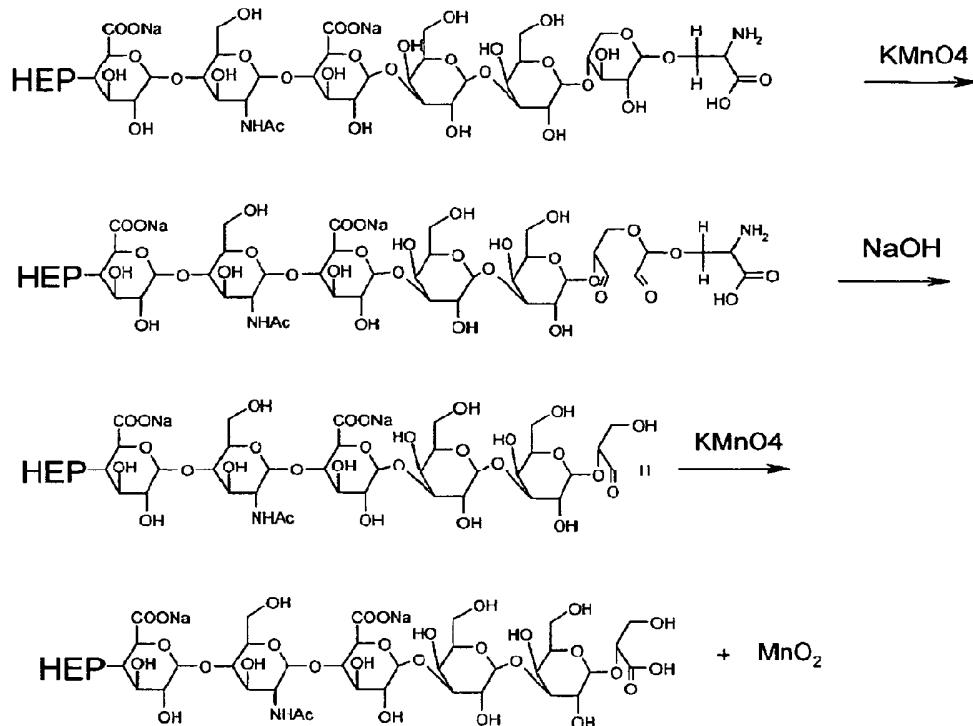
Reacção 1:



Reacção 2:

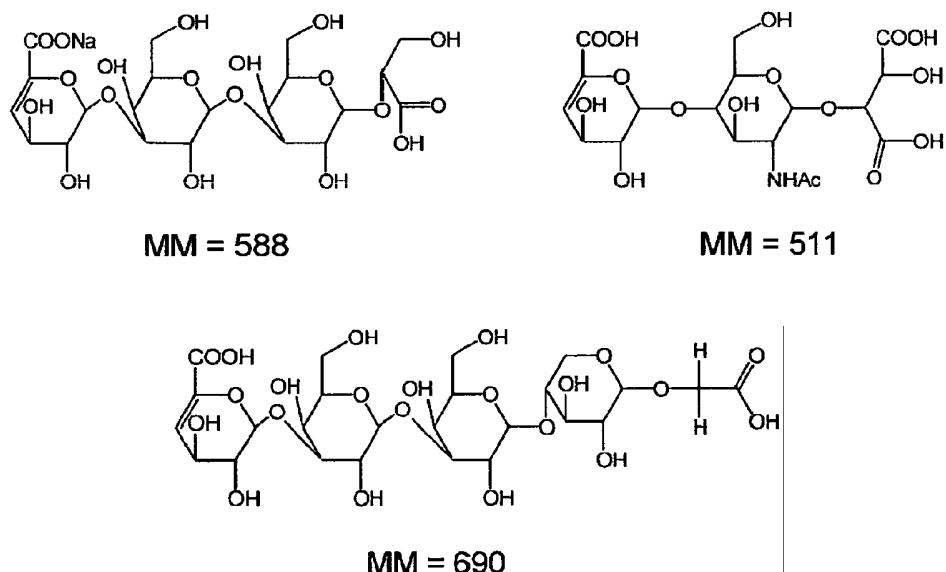


Reacção 3:



Para identificar os pontos de clivagem, o método geral é que a heparina tratada com, por exemplo, permanganato de potássio como descrito acima, seja submetida à acção de heparinase III. Esta enzima é altamente específica para as regiões não sulfatadas da heparina. Esta despolimeriza selectivamente as unidades dissacáridas contendo ácido urónico livre de 2-O-sulfato e o domínio para a heparina se ligar à proteína (a proteína que contém as cadeias de heparina é uma cadeia de serina-glicina). Na formação de  $\Delta$ IVa, os dissacáridos  $\Delta$ IV do componente  $\Delta$ IVa-Gal-Gal-Xyl-Ser ou de qualquer derivado oxidado desta região de ligação que contém o dissacárido IVa são principalmente observados após digestão com heparinase III. Esta enzima não afecta o restante da cadeia de heparina. Consequentemente, o material despolimerizado contém uma mistura de oligossacáridos de heparina (dissacáridos a tetrassacáridos) e outros polissacáridos. Esta mistura requer um pré-tratamento

para eliminar as cadeias de heparina antes de puderem ser analisadas por Cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC). Um especialista na técnica estará familiarizado com uma variedade de métodos para eliminar cadeias de heparina, incluindo, por exemplo, ultracentrifugação através de uma membrana de Millipore (5 kDa) ou precipitação com metanol seguida por centrifugação. A solução assim preparada pode ser depois analisada por HPLC. Os seguintes fragmentos podem ser identificados por HPLC de acoplamento de (grafite porosa)/espectrometria de massa ("MM" significa massa molecular):

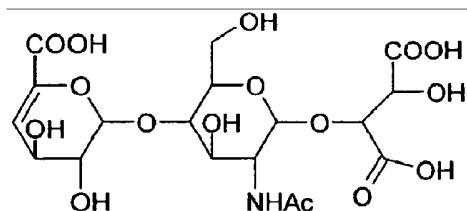


As estruturas do tetrassacárido MM=690 e do trissacárido M=588 foram confirmadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

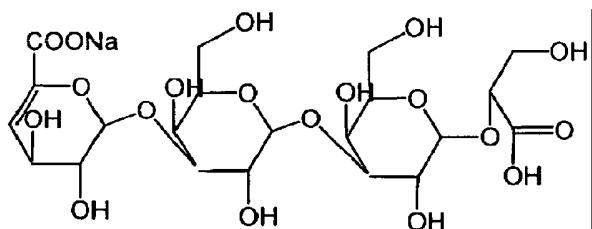
Esses fragmentos demonstram que o tratamento com permanganato de potássio de acordo com a invenção actua selectivamente desde cerca de ligação a proteína e elimina o resíduo de serina. O composto MM=690 é o resultado da reacção 1, seguida por digestão enzimática. O composto MM=511 é o resultado

da reacção 2, seguida por digestão enzimática. O composto MM=588 é o resultado da reacção 3, seguida por digestão enzimática.

A presente invenção refere-se a um composto substancialmente puro tendo a fórmula:



ou

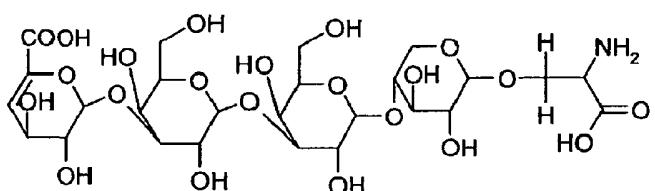


Os compostos MM=511, MM=588 e MM=690 anteriores podem ser isolados e obtidos em forma substancialmente pura. Como aqui utilizado, "substancialmente puro" significa suficientemente puro para identificar os compostos por espectroscopia de massa ou RMN. Numa forma de realização, um composto substancialmente puro é um que está, pelo menos, 80% puro. Noutra forma de realização, um composto substancialmente puro é um que está, pelo menos, 90% puro.

É descrito um método para determinar o teor oligossacarídico de uma amostra de uma heparina ou produto de heparina compreende despolimerizar a amostra e analisar a amostra utilizando um processo cromatográfico para detectar oligossacáridos escolhidos de MM=511, MM=588 e MM=690. O teor oligossacarídico pode ser quantificado por calibração externa ou interna. É descrito que a calibração interna compreende um padrão interno, em que o

referido padrão interno pode ser um composto substancialmente puro seleccionado de MM=511, MM=588 e MM=690.

Para a identificação estrutural, utilizando HPLC, o tetrassacárido característico do domínio de ligação (glycoserina) pode ser isolado e identificado por RMN (por exemplo, uma heparina em bruto pode ser despolimerizada selectivamente por ação de heparinase III):



Yamada *et al.* caracterizou este fragmento ao estudar a despolimerização da heparina por heparinases em Yamada *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270 (39): 22914 (1995); *J. Biol. Chem.* 267(3): 1528 (1992); *Biochemistry*, 38: 838 (1999). Hiromi Tsuda *et al.* (European Journal of Biochemistry, vol. 62, 1999, p. 127-133) refere-se ao estudo de modificações estruturais do ligante -HexA-HexNAc-GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser, que liga o glicosaminoglicano e a proteína, utilizando oligossacáridos conhecidos compreendendo um resíduo de serina. O documento U.S. 4496550 refere-se a oligossacáridos compreendendo 4 a 8 unidades monossacarídicas, as quais possuem actividade anticoagulante.

Uma vez que os problemas de coloração têm potencialmente impacto na estabilidade em armazenamento de preparações de heparina, LMWH e ULMWH e requerem, assim, controlo de qualidade durante o processo de fabrico, é também descrito um método para analisar tais preparações de modo a detectar e/ou quantificar a presença de glycoserina e dos seus derivados oxidados. O referido método pode compreender os seguintes passos:

- a) despolimerização da amostra;
- b) se a amostra for heparina ou um produto de heparina, separação dos oligossacáridos resultantes por HPLC; e
- c) detecção dos oligossacáridos que contêm glicosserina e/ou os seus derivados oxidados.

A despolimerização da amostra pode ser realizada através da acção de uma mistura de heparinases compreendendo, por exemplo, heparinase 1 (EC 4.2.2.7.), heparinase 2 (heparina liase II) e heparinase 3 (EC 4.2.2.8.), que estão disponíveis a partir da Grampian Enzymes. A despolimerização enzimática pode ser realizada durante um período de horas, o qual pode ser determinado por um especialista na técnica, a uma temperatura apropriada, que pode também ser determinada por um especialista na técnica. Por exemplo, a despolimerização enzimática pode ser realizada durante 48 horas à temperatura ambiente, por mistura de 20  $\mu$ L de uma solução aquosa contendo 20 mg/mL de heparina a ser testada e 100  $\mu$ L de uma solução 100 mM de ácido acético/NaOH, a pH 7,0, contendo 2 mM de acetato de cálcio e 2 mg/mL de BSA, com 20  $\mu$ L de uma solução stock compreendendo uma mistura de heparinase 1, heparinase 2 e heparinase 3, compreendendo 0,5 unidades/mL de cada heparinase 1, 2 e 3. Um especialista na técnica pode adaptar prontamente estas condições exemplificativas a diferentes quantidades de substrato e enzima.

É também descrito que os vários polissacáridos e oligossacáridos presentes numa amostra despolimerizada são separados e quantificados utilizando métodos conhecidos dos especialistas na técnica. Por exemplo, polissacáridos e oligossacáridos compreendendo glicosserina e os seus derivados oxidados podem ser separados por HPLC utilizando cromatografia

de permuta aniónica, por exemplo, com uma fase estacionária ligada com derivados de amónio quaternário, tal como  $-\text{NMe}_3^+$ . A coluna de cromatografia pode ser cheia com qualquer uma, de uma variedade de resinas disponíveis, por exemplo, do tipo Spherisorb SAX com tamanhos de partícula na gama, por exemplo, de 5 a 10  $\mu\text{m}$ .

O dispositivo utilizado pode ser qualquer cromatógrafo que permita a formação de um gradiente de eluição e que possa utilizar um detector de UV. O detector de UV pode ser um sistema de diódos que pode medir espectros de UV para os constituintes em, pelo menos, dois comprimentos de onda diferentes e registar sinais resultantes da diferença entre as absorvências a estes comprimentos de onda diferentes. Isto permite a detecção específica de oligossacáridos acetilados. Para permitir este tipo de detecção, podem ser utilizadas fases móveis que são transparentes à luz UV até 200 nm. As fases móveis exemplificativas podem ser baseadas em sais de perclorato, metanossulfonato ou fosfato. E o pH da fase móvel para a separação pode ser desde cerca de 2,0 a cerca de 6,5. O pH da fase móvel pode ser cerca de 3. Como os polissacáridos não acetilados todos têm, a um dado pH, um espectro UV bastante semelhante, não é possível detectar selectivamente açúcares acetilados tomando, como sinal, a diferença entre a absorvência a dois comprimentos de onda escolhidos, de modo que a absorvidade dos sacáridos não acetilados seja cancelada. A quantificação de polissacáridos e oligossacáridos compreendendo glicosserina e os seus derivados oxidados, pode ser realizada utilizando métodos para calibração externa ou interna. É descrito que o padrão interno utilizado é ácido 2-naftol-3,6-dissulfónico e que a solução aquosa de heparina a ser testada contém cerca de 0,15 g/L de ácido 2-naftol-3,6-dissulfónico. A amostra despolimerizada pode ser testada por cromatografia de

acordo com o método descrito na Patente FR 0211724, apresentada em 23 de Setembro de 2002, o qual é aqui incorporada por referência e ilustrada abaixo para a sua aplicação específica ao método para testar o teor de glicosserina.

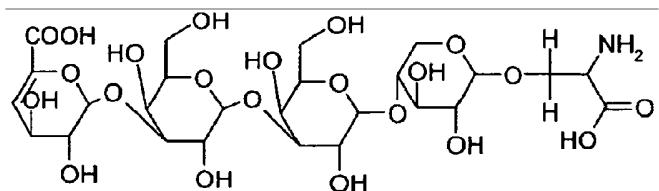
A título de exemplo, as condições possíveis para a separação cromatográfica de acordo com a descrição são dadas abaixo:

- coluna spherisorb SAX de 5  $\mu\text{m}$ , 25 cm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno.
- Solvente A: 2,5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  equilibrado a pH 2,9 por adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .
- Solvente B: 1 N de  $\text{NaClO}_4$  - 2,5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  equilibrado a pH 3,0 por adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

O gradiente de eluição pode ser como se segue:

- $T = 0$  min: % de B = 3;
- $T = 40$  min: % de B = 60; e
- $T = 60$  min: % de B = 80.

Um chromatograma representativo do resultado de analisar um material despolimerizado de heparina de acordo com estas condições exemplificativas é mostrado na figura 2. O tetrassacárido do método de análise como descrito acima é:



Um método de detecção utilizado durante a separação chromatográfica é também aqui descrito. Um método foi

desenvolvido de modo a aumentar a especificidade da detecção UV. Como mostrado na figura 3, 202 nm e 240 nm serão escolhidos como comprimentos de onda de detecção e referência e os sinais a 202 - 240 nm serão anotados. Um detector adequado para esta técnica é o detector DAD 1100 da empresa Agilent Technologies. Neste caso, uma detecção dupla será realizada, primeiro a 234 nm e depois a 202-240 nm. É aqui descrito um método de análise como definido acima, utilizando separação por cromatografia de permuta aniónica, em que o método de detecção torna possível detectar selectivamente açúcares acetilados.

Adicionalmente, é também descrito um método de análise como definido acima, utilizando separação por cromatografia de permuta, em que a detecção selectiva dos açúcares acetilados é realizada tomando, como o sinal, a diferença entre a absorvência em dois comprimentos de onda escolhidos de modo que a absorvância dos sacáridos não acetilados seja cancelada.

### **Preparação para análise colorimétrica da amostra**

Uma solução em água pode ser preparada de modo que a concentração seja ajustada a 100 mg/mL e a solução obtida seja depois filtrada através de um filtro de membrana com uma porosidade de 0,22 µm. O valor da absorvência a 400 nm é depois medido. Esta medida corresponde ao valor inicial para o estudo. A solução é distribuída em sete frascos a uma taxa de aproximadamente 5 mL por frasco. As amostras são depois deixadas a repousar por colocação das mesmas num forno a 45 °C. A cada semana um frasco é retirado do forno e o valor da absorvência a 400 nm é medido a 20 °C. Após 6 semanas, a adequabilidade da amostra pode ser determinada.

**Nomenclatura dos sacáridos e relação aos picos de acordo com o cromatograma na figura 2:**

IdoA: ácido  $\alpha$ -L-idopiranosilurónico;

GlcA: ácido  $\beta$ -D-glucopiranosilurónico;

$\Delta$ GlcA: ácido 4,5-insaturado: ácido 4-desoxi- $\alpha$ -L-treo-hex-4-enopiranosilurónico;

Gal: D-galactose;

Xyl: xilose;

GlcNAc: 2-desoxi-2-acetamido- $\alpha$ -D-glucopiranose;

GlcNS: 2-desoxi-2-sulfamido- $\alpha$ -D-glucopiranose;

2S: 2-O-sulfato;

3S: 3-O-sulfato;

6S: 6-O-sulfato;

1:  $\Delta$ GlcA $\beta$ 1-3 Gal  $\beta$ 1-3 Gal  $\beta$ 1-4 Xyl  $\beta$ 1-0-Ser

2: (ácido 4-desoxi- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1  $\rightarrow$  4)-2-desoxi-2-acetamido- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal de sódio;

5: (ácido 4-desoxi- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1  $\rightarrow$  4)-2-desoxi-2-sulfamido- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal dissódico;

6: (ácido 4-desoxi- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1  $\rightarrow$  4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal dissódico;

9: (ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1  $\rightarrow$  4)-2-desoxi-2-acetamido- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal dissódico;

11: (ácido 4-deoxi- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1  $\rightarrow$  4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal trissódico;

12: (ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1  $\rightarrow$  4)-2-desoxi-2-sulfamido- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal trissódico;

14: (ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1  $\rightarrow$  4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal trissódico;

15: (ácido 4-desoxi- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1  $\rightarrow$  4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  4)-(ácido

$\beta$ -D-glucopiranosilurónico)-(1 → 4)-2-desoxi-2-sulfamido-3-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal pentassódico;

16: (ácido 4-desoxi-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 → 4)-2-desoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal tetrassódico;

17: (ácido 4-desoxi- $\alpha$ -L-treo-hexenopiranosilurónico)-(1 → 4)-2-desoxi-2-acetamido-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 → 4)-(ácido  $\beta$ -D-glucopiranosilurónico)-(1 → 4)-2-desoxi-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopiranose, sal hexassódico.

Assim, o método como descrito acima inclui um método para pré-tratamento da amostra antes de ser analisada e o processo cromatográfico utilizado para determinação da presença ou ausência do tetrassacárido característico do domínio de ligação.

### **EXEMPLOS**

Nos seguintes exemplos a abreviatura "NI" significa normalização interna. Os Exemplos 6-11 demonstram a influência da temperatura e da concentração de permanganato de potássio na eliminação de resíduos de glicosserina a partir de heparina.

#### **EXEMPLO 1: Preparação de Heparina "Melhorada"**

Este processo aumenta a actividade anti-Xa de uma preparação de heparina em bruto e pode ser empregue antes de utilizar uma preparação de heparina no processo para remover resíduos de glicosserina. A heparina "melhorada" preparada neste exemplo foi utilizada nos exemplos 2-10. E a actividade anti-Xa inicial da

preparação de heparina em bruto utilizada neste exemplo é 150 IU/mg.

Quinhentos e vinte mililitros de água e 112,5 g de NaCl (20% p/v) foram introduzidos num reactor de 2 L. Após dissolução, 60,0 g de heparina em bruto foram adicionados à solução. Após agitação mecânica durante 30 minutos, o precipitado na suspensão foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3 contendo 33,9 g de clarcel. O filtro de vidro sinterizado foi depois lavado com 120 mL de solução de NaCl a 20% (p/v). O filtrado obtido (704 mL) foi carregado num reactor de 2 L e foi aí vertido rapidamente metanol (388 mL), na presença de agitação mecânica. Após agitar durante aproximadamente 2 horas a uma temperatura de cerca de 20 °C, a suspensão foi deixada a sedimentar de um dia para o outro. O sobrenadante (804 mL) foi removido e rejeitado e o precipitado sedimentado foi recuperado numa solução a 20% de NaCl (73,5 g de NaCl em 368 mL de água). Após agitar durante 30 minutos, 385 mL de metanol foram adicionados rapidamente. Após agitar durante aproximadamente 1 hora a uma temperatura de cerca de 20 °C, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O sobrenadante (840 mL) foi depois removido e rejeitado e foi adicionado metanol (400 mL) ao precipitado sedimentado. Uma vez mais, após agitar durante aproximadamente 1 hora, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas e o sobrenadante (430 mL) foi removido e rejeitado. Foi adicionado metanol (400 mL) ao precipitado sedimentado. Após agitar esta solução durante 1 hora, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. Após sedimentação, o precipitado suspenso foi filtrado através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido foi lavado duas vezes com 400 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6 kPa), a uma temperatura de

cerca de 40 °C. Após secar, foram obtidos 43,7 g de heparina "melhorada". O rendimento foi 73%.

Os resíduos de glicosserina não são afectados por estes tratamentos e a percentagem de glicosserina na amostra (% de NI) foi 2,4.

**EXEMPLO 2: Heparina "Melhorada" Oxidada com Permanganato de Potássio e Despirogenada**

Doze gramas de heparina "melhorada" obtida como descrito no exemplo 1 e 120 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. A temperatura da mistura foi ajustada até 40 °C com agitação magnética. O pH da mistura foi ajustado a  $8,7 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a 80 °C e 0,96 g de  $\text{KMnO}_4$  sólido foi adicionado. Após agitar durante 15 minutos, a mistura foi deixada a floacular durante 1 hora a 80 °C. Foi depois adicionado carcel (1,2 g). Após agitar durante 15 minutos, o precipitado foi recolhido por filtração através de um filtro de vidro sinterizado número 3 contendo 15 g de clarcel. O precipitado foi lavado com 25 mL de água a 60 °C e depois com 25 mL de água a 20 °C. Depois, o filtrado (180 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL e 1,8 g de  $\text{NaCl}$  foram adicionados ao filtrado de modo a obter uma solução a 1%. O pH foi ajustado a aproximadamente  $11,2 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio a 1 N. O meio reaccional foi aquecido a 45 °C durante 2 horas e foi depois deixado a agitar lentamente a cerca de 20 °C durante aproximadamente 12 horas. Esta solução foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3 e o funil foi lavado com 15 mL de solução de  $\text{NaCl}$  a 20% (p/v). O filtrado foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL e foram adicionados 1,2 mL de uma

solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 30%. O meio reaccional foi deixado a agitar lentamente a cerca de 20 °C durante aproximadamente 12 horas. O pH foi ajustado a  $6,2 \pm 0,3$  por adição de uma solução de HCl 6 N e a concentração de NaCl foi ajustada a 3%. Esta solução foi filtrada através de uma membrana com uma porosidade de 1  $\mu\text{m}$  e a membrana foi lavada com 5 mL de água. O filtrado (204 mL) recolhido desta filtração foi colocado num balão Erlenmeyer de 500 mL e metanol (163 mL) foi adicionado rapidamente na presença de agitação magnética. Após agitar vigorosamente durante 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O sobrenadante (295 mL) foi depois removido e rejeitado e metanol (70 mL) foi adicionado ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante 3 horas. Depois o sobrenadante (80 mL) foi removido e rejeitado e metanol (60 mL) foi adicionado ao precipitado sedimentado. Após agitar durante 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O precipitado em suspensão foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido desta filtração foi lavado com duas porções de 25 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6 kPa), a uma temperatura de cerca de 40 °C. Após secar, foram obtidos 10,33 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 86,1%.

A composição obtida tinha as seguintes características:  
% de NI de glicosserina = 0

Actividade anti-Xa = 203,5 IU/mg

**EXEMPLO 3: Heparina "Melhorada" Sem Oxidação e com Despirogenação**

Doze gramas de heparina "melhorada" obtida como descrito no exemplo 1 e 120 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. NaCl (1,21 g) foi adicionado de modo a obter uma solução a 1%. O pH foi ajustado a aproximadamente 11,2  $\pm$  0,3 por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a 45 °C durante 2 horas e foi depois deixado a agitar lentamente a uma temperatura de cerca de 20 °C durante aproximadamente 12 horas. A solução foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3 e o funil foi lavado com 10 mL de solução de NaCl a 20% (p/v). O filtrado obtido foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL e foram adicionados 1,2 mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 30%. O meio reaccional foi agitado lentamente a uma temperatura de cerca de 20 °C durante 12 horas. O pH foi ajustado a 6,2  $\pm$  0,3 por adição de uma solução de HCl 6 N e a concentração de NaCl foi ajustada a 3%. Esta solução foi filtrada através de uma membrana com uma porosidade de 1  $\mu$ m. O filtrado (138 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL e metanol (110 mL) foi adicionado rapidamente na presença de agitação magnética. Após agitar durante 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O sobrenadante (195 mL) foi depois removido e rejeitado e metanol (55 mL) foi adicionado ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 1 hora. O sobrenadante (57 mL) foi removido outra vez e rejeitado. O metanol (55 mL) foi adicionado ao precipitado sedimentado. Após agitar durante 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O precipitado foi depois recolhido por filtração através um funil de vidro sinterizado número 3 e o bolo obtido

foi lavado com 2 porções de 25 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6 kPa), a uma temperatura de cerca de 40 °C. Após secar, foram obtidos 11,12 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 92,7%.

A composição obtida tinha as seguintes características:  
% de NI de glicosserina = 2,4

Actividade anti-Xa = 203,7 IU/mg

**EXEMPLO 4: Heparina "Melhorada" Sem Oxidação e Sem Despirogenação**

12 g de heparina "melhorada" obtida como descrito no exemplo 1 e 120 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. O pH foi ajustado a aproximadamente  $11,2 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio a 1 N e foram adicionados 1,2 mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio. O meio reaccional foi deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. O pH foi ajustado de volta a  $6,2 \pm 0,3$  por adição de uma solução de HCl 6 N e o título de NaCl foi ajustado para 3%. Esta solução foi filtrada através de uma membrana com uma porosidade de 1  $\mu\text{m}$  e foi lavada com 2 mL de água. O filtrado obtido (133 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 500 mL e metanol (106 mL) foi aí adicionado rapidamente na presença de agitação magnética. Após agitar durante 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar até ao dia seguinte. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (190 mL) e 50 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar

durante 4 horas. O sobrenadante foi removido outra vez e depois rejeitado (48 mL) e 50 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante 30 minutos, a suspensão foi depois deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. Após sedimentação, o precipitado em suspensão foi filtrado através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido foi depois lavado com duas porções de 25 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6 kPa), a uma temperatura desde cerca de 40 °C. Após secar, foram obtidos 10,48 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 87,35%.

A composição obtida tinha as seguintes características:  
% de NI de glicosserina = 2,4

Actividade anti-Xa = 209,5 IU/mg

**EXEMPLO 5: Heparina "Melhorada" Com Oxidação e Sem Despirogenação**

12 g de heparina "melhorada" obtida de acordo com o exemplo 1 e 120 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. A mistura foi ajustada até 40 °C na presença de agitação magnética. O pH foi ajustado a  $8,7 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a cerca de 80 °C e 0,96 g de KMnO<sub>4</sub> sólido foi adicionado ao meio reaccional. Após agitar durante 15 minutos, a mistura foi deixada a flocular durante 1 hora a 80 °C. 1,2 g de clarcel foram depois adicionados. Após agitar durante 15 minutos, o precipitado em suspensão foi filtrado através de um funil de vidro sinterizado número 3 contendo 15 g de clarcel. Isto foi lavado sucessivamente com 25 mL de água a 60 °C e depois com

25 mL de água a 20 °C. O filtrado (178 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL e foram aí adicionados 1,2 mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 30%. A mistura reaccional foi deixada a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. O pH foi ajustado de volta a  $6,2 \pm 0,3$  por adição de uma solução de HCl 6 N e o título de NaCl foi ajustado para 3%. Esta solução foi filtrada depois através de uma membrana com uma porosidade de 1  $\mu\text{m}$  e lavada com 2 mL de água. O filtrado obtido (192 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 500 mL e foram aí adicionados rapidamente 154 mL de metanol, na presença de agitação magnética. Após agitar durante 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar até ao dia seguinte. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (283 mL) e 60 mL de metanol foram adicionados ao sedimento precipitado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante 4 horas. O sobrenadante foi outra vez removido e rejeitado (58 mL) e foram adicionados mais 60 mL de metanol ao precipitado sedimentado. Após agitar durante 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O precipitado em suspensão foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido foi depois lavado com duas porções de 25 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6 kPa), a uma temperatura desde cerca de 40 °C. Após secar, foram obtidos 10,31 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 85,9%.

A composição obtida tinha as seguintes características:  
% de NI de glicosserina = 0

Actividade anti-Xa = 210,3 IU/mg

**EXEMPLO 6: Heparina "Melhorada" Oxidada em 8% de KMnO<sub>4</sub> a**

**80 °C**

10 g de heparina "melhorada" obtida de acordo com o exemplo 1 e 100 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. A mistura foi ajustada até 40 °C na presença de agitação magnética. O pH foi ajustado a 8,7 ± 0,3 por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a 80 °C e 0,80 g de KMnO<sub>4</sub> sólido foi adicionado a este. Após agitar durante 15 minutos, a mistura foi deixada a floacular durante 1 hora a 80 °C. 1,0 g de clarcel foram depois adicionados. Após agitar durante 15 minutos, o precipitado em suspensão foi filtrado através de um funil de vidro sinterizado número 3 contendo 15 g de clarcel. Isto foi lavado sucessivamente com 25 mL de água a 60 °C e depois com 25 mL de água a 20 °C. O filtrado obtido (152 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL e foram aí adicionados 1,5 g de NaCl de modo a obter uma solução a 1%. O pH foi ajustado a aproximadamente 11 ± 0,3 por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a aproximadamente 45 °C durante 2 horas e foi depois deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. A solução foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O filtrado obtido foi introduzido num balão Erlenmeyer de 250 mL e foi aí adicionado 1,0 mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 30%. O meio reaccional foi deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. O pH foi ajustado de volta a 6,2 ± 0,3 com uma solução de HCl 6 N e o título de NaCl foi ajustado para 3%. Esta solução foi filtrada através de uma membrana com uma porosidade de 1 µm e metade do filtrado (70 mL) foi colocada num balão Erlenmeyer de 250 mL e foram aí adicionados rapidamente 56 mL de metanol, na presença de agitação magnética. Após agitar durante

30 minutos, a mistura foi deixada a sedimentar. O sobrenadante foi removido e depois rejeitado (118 mL) e 60 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (54 mL) e 50 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O precipitado em suspensão foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido foi depois lavado com duas porções de 25 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6kPa), a uma temperatura desde cerca de 40 °C. Após secar, foram obtidos 2,80 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 63,3%.

A composição obtida tinha as seguintes características:

% de NI de glicosserina = 0,0

**EXEMPLO 7: Heparina "Melhorada" Oxidada em 4% de KMnO<sub>4</sub> a 80 °C**

10 g de heparina "melhorada" obtida de acordo com o exemplo 1 e 100 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. A mistura foi ajustada até 40 °C na presença de agitação magnética. O pH foi ajustado a 8,7 ± 0,3 por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reacional foi aquecido a 80 °C e foram aí adicionados 0,40 g de KMnO<sub>4</sub> sólido. Após agitar durante 15 minutos, a mistura foi deixada a floacular durante 1 hora a 80 °C. Foi aí adicionado 1,0 g de clarcel. Após agitar durante 15 minutos, o precipitado em suspensão foi

filtrado através de um funil de vidro sinterizado número 3 contendo 15 g de clarcel. Isto foi lavado sucessivamente com 25 mL de água a 60 °C e depois com 25 mL de água a 20 °C. O filtrado obtido (158 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL e foram aí adicionados 1,6 g de NaCl de modo a obter uma solução a 1%. O pH foi ajustado a aproximadamente  $11 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a 45 °C durante 2 horas e foi depois deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. A solução foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O filtrado foi introduzido outra vez num balão Erlenmeyer de 250 mL e foi adicionado 1,0 mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 30%. O meio reaccional foi deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. O pH foi ajustado de volta a  $6,2 \pm 0,3$  com uma solução de HCl 6 N e o título de NaCl foi ajustado para 3%. Esta solução foi filtrada através de uma membrana com uma porosidade de 1  $\mu\text{m}$ . O filtrado (152 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 500 mL e foram aí adicionados rapidamente 122 mL de metanol, na presença de agitação magnética. O sobrenadante foi removido e rejeitado (251 mL) e 100 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (97 mL) e 100 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O precipitado em suspensão foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido foi depois lavado com duas porções de 30 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco a pressão reduzida (6 kPa), a uma temperatura desde cerca de

40 °C. Após secar, foram obtidos 6,4 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 71%.

A composição obtida tinha as seguintes características:

% de NI de glicosserina = 0,0

**EXEMPLO 8: Heparina "Melhorada" Oxidada em 8% de KMnO<sub>4</sub> a 40 °C**

10 g de heparina "melhorada" obtida de acordo com o exemplo 1 e 100 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. A mistura foi ajustada até 40 °C na presença de agitação magnética. O pH foi ajustado  $8,7 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reacional foi depois aquecido a 40 °C e foram aí adicionados 0,80 g de KMnO<sub>4</sub> sólido. Após agitar durante 15 minutos, a mistura foi deixada a floacular durante 1 hora a 80 °C. Foi aí adicionado 1,0 g de clarcel. Após agitar durante 15 minutos, o precipitado em suspensão foi filtrado através de um funil de vidro sinterizado número 3 contendo 15 g de clarcel. Isto foi sequencialmente lavado com 25 mL de água a 60 °C e depois 25 mL de água a 20 °C. O filtrado obtido (142 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL e foram adicionados 1,42 g de NaCl de modo a obter uma solução a 1%. O pH foi ajustado a aproximadamente  $11 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio a 1 N. O meio reacional foi aquecido a 45 °C durante 2 horas e depois deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. A solução foi depois filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O filtrado foi introduzido outra vez num balão Erlenmeyer de 250 mL e foi adicionado 1,0 mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 30%. O meio reacional foi

deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. O pH foi ajustado de volta a 6,2 ± 0,3 com uma solução de HCl 6 N e o título de NaCl foi ajustado para 3%. Esta solução foi filtrada através de uma membrana com uma porosidade de 1 µm e metade do filtrado (80 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL. Foram aí adicionados rapidamente 64 mL de metanol na presença de agitação magnética. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar. O sobrenadante foi removido e depois rejeitado (131 mL) e 60 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (52 mL) e 50 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. A suspensão foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido foi depois lavado com duas porções de 25 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6 kPa), a uma temperatura desde cerca de 40 °C. Após secar, foram obtidos 2,3 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 54%.

A composição obtida tinha as seguintes características:

% de NI de glicosserina= 0,0

**EXEMPLO 9: Heparina "Melhorada" Oxidada com 8% de KMnO<sub>4</sub> a 60 °C**

10 g de heparina "melhorada" obtida de acordo com o exemplo 1 e 100 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. A mistura foi ajustada até 40 °C com agitação magnética. O pH foi ajustado a  $8,7 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reacional foi aquecido a 60 °C e foram aí adicionados 0,80 g de KMnO<sub>4</sub> sólido. Após agitar durante 15 minutos, a mistura foi deixada a flocular durante 1 hora a 80 °C. Foi depois adicionado 1,0 g de clarcel. Após agitar durante 15 minutos, o precipitado em suspensão foi filtrado através de um funil de vidro sinterizado 3 contendo 15 g de clarcel. Isto foi depois lavado com 25 mL de água a 60 °C e depois 25 mL de água a 20 °C. O filtrado obtido (150 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL. Foram adicionados 1,5 g de NaCl de modo a obter uma solução a 1%. O pH foi ajustado a aproximadamente  $11 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reacional foi aquecido a 45 °C durante 2 horas e foi depois deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. A solução foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O filtrado foi introduzido outra vez num balão Erlenmeyer de 250 mL e foi adicionado 1,0 mL de solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 30%. O meio reacional foi deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. O pH foi ajustado de volta a  $6,2 \pm 0,3$  com uma solução de HCl 6 N e o título de NaCl foi ajustado para 3%. Esta solução foi filtrada através de uma membrana com uma porosidade de 1 µm e metade do filtrado (70 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL. Foram aí adicionados rapidamente 56 mL de metanol, na presença de agitação magnética. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (118 mL) e 60 mL de metanol foram adicionados ao

precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a mistura foi deixada a sedimentar durante aproximadamente 12 horas. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (54 mL) e 50 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. A suspensão foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido foi depois lavado com duas porções de 25 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6 kPa), a uma temperatura desde cerca de 40 °C. Após secar, foram obtidos 3,12 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 68%.

A composição obtida tinha as seguintes características:

% de NI de glicosserina = 0,0

EXEMPLO 10: Heparina "Melhorada" Oxidada com 2% de KMnO<sub>4</sub> a 80 °C

10 g da heparina "melhorada" obtida acima e 100 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. A mistura foi ajustada até 40 °C na presença de agitação magnética. O pH foi ajustado a 8,7 ± 0,3 por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a 80 °C e foram aí adicionados 0,16 g de KMnO<sub>4</sub> sólido. Após agitar durante 15 minutos, a mistura foi deixada a flocular durante 1 hora a 80 °C. Foi depois adicionado 1,0 g de clarcel. Após agitar durante 15 minutos, o precipitado em suspensão foi filtrado através de um funil de vidro sinterizado número 3 contendo 15 g de clarcel. Isto foi depois lavado com 25 mL de água a 40 °C e depois 25 mL de água a 20 °C. O filtrado (114 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL. Foram adicionados 1,14 g de NaCl de modo a obter uma solução a 1%. O pH foi ajustado a

aproximadamente  $11 \pm 0,3$  por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas e foi depois deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de  $20^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas. A solução foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O filtrado foi introduzido outra vez num balão Erlenmeyer de 250 mL e foram adicionados 0,8 mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 30%. O meio reaccional foi deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de  $20^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas. O pH foi ajustado de volta a  $6,2 \pm 0,3$  com uma solução de HCl 6 N e o título de NaCl foi ajustado para 3%. Esta solução foi filtrada através de uma membrana com uma porosidade de 1  $\mu\text{m}$  e metade do filtrado (75 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL. Foram adicionados rapidamente 60 mL de metanol, na presença de agitação magnética. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a mistura foi deixada a sedimentar. O sobrenadante foi removido e depois rejeitado (120 mL) e são adicionados 50 mL de metanol ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a mistura foi deixada a sedimentar. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (38 mL) e 40 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a suspensão foi deixada a sedimentar. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (27 mL) e 30 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. A suspensão foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido foi depois lavado com duas porções de 25 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6 kPa) a uma temperatura desde cerca de  $40^{\circ}\text{C}$ . Após secar, foram obtidos 2,61 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 72%.

A composição obtida tinha as seguintes características:

% de NI de glicosserina = 0,8

**EXEMPLO 11: Heparina "Melhorada" Oxidada com 2% de KMnO<sub>4</sub> a 60 °C**

10 g de heparina "melhorada" obtida de acordo com o exemplo 1 e 100 mL de água destilada foram introduzidos num balão Erlenmeyer de 250 mL. A mistura foi ajustada até 40 °C na presença de agitação magnética. O pH foi ajustado a 8,7 ± 0,3 por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a 60 °C e foram aí adicionados 0,16 g de KMnO<sub>4</sub> sólido. Após agitar durante 15 minutos, a mistura foi deixada a flocular durante 1 hora a 60 °C. Foi depois adicionado 1,0 g de clarcel. Após agitar durante 15 minutos, o precipitado em suspensão foi filtrado através de um funil de vidro sinterizado número 3 contendo 15 g de clarcel. Isto foi depois lavado com duas porções de 20 mL de água a 40 °C. O filtrado (129 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL. Foram aí adicionados 1,29 g de NaCl de modo a obter uma solução a 1%. O pH foi ajustado a aproximadamente 11 ± 0,3 por adição de hidróxido de sódio 1 N. O meio reaccional foi aquecido a 45 °C durante 2 horas e foi depois deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. A solução foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O filtrado foi introduzido outra vez num balão Erlenmeyer de 250 mL e foram adicionados 0,8 mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 30%. O meio reaccional foi deixado a agitar lentamente a uma temperatura desde cerca de 20 °C durante 12 horas. O pH foi ajustado de volta a 6,2 ± 0,3 com uma solução de HCl 6 N e o título de NaCl foi ajustado para 3%. Esta solução

foi filtrada através de uma membrana com uma porosidade de 1  $\mu\text{m}$  e metade do filtrado (75 mL) foi colocado num balão Erlenmeyer de 250 mL. Foram aí adicionados rapidamente 60 mL de metanol, na presença de agitação magnética. O sobrenadante foi removido e depois rejeitado (120 mL) e 50 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a mistura foi deixada a sedimentar. O sobrenadante foi depois removido e depois rejeitado (32 mL) e 30 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. Após agitar durante aproximadamente 30 minutos, a mistura foi deixada a sedimentar. O sobrenadante foi depois removido e rejeitado (26 mL) e 30 mL de metanol foram adicionados ao precipitado sedimentado. A suspensão é filtrada através de um funil de vidro sinterizado número 3. O bolo obtido foi depois lavado duas vezes com 25 mL de metanol. O sólido húmido foi seco por filtração e depois seco sob pressão reduzida (6 kPa), a uma temperatura desde cerca de 40 °C. Após secar, foram obtidos 2,24 g de heparina "purificada". O rendimento obtido foi 62%.

A composição obtida tinha as seguintes características:

% de NI de glicosserina = 0,9

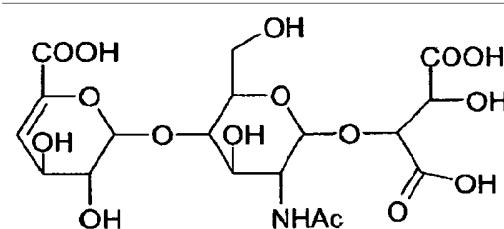
**Tabela 1: Actividade Anti-Xa das Heparinas Obtidas Com ou Sem Tratamento com KMnO<sub>4</sub>**

<b><i>Ensaio</i></b>	<b><i>Rendimento</i></b>	<b><i>aXa</i></b> <b><i>IU/mg</i></b>	<b><i>aXa</i></b> <b><i>USP/mg</i></b>	<b><i>Comentários</i></b>
Exemplo 2	86,1%	203,5	190,5	Tratamento de KMnO <sub>4</sub> : sim Despirogenação: sim
Exemplo 3	92,7%	203,7	186,8	Tratamento de KMnO <sub>4</sub> : não Despirogenação: sim
Exemplo 4	87,3%	209,5	191	Tratamento de KMnO <sub>4</sub> : não Despirogenação: não
Exemplo 5	85,9%	210,3	176,2	Tratamento de KMnO <sub>4</sub> : sim Despirogenação: não

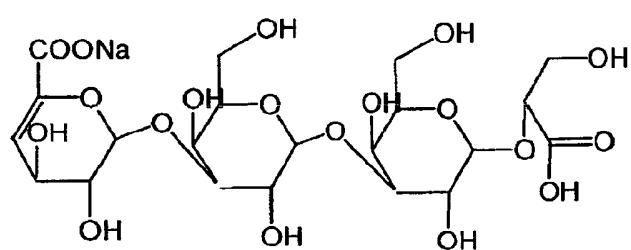
Lisboa, 9 de Abril de 2013

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto substancialmente puro tendo a fórmula:



ou



Lisboa, 9 de Abril de 2013

Figura 1

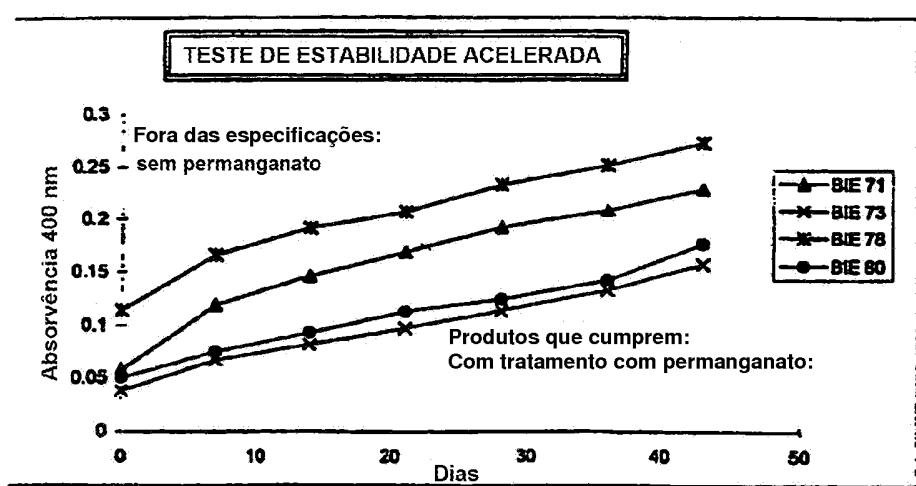


Figura 2

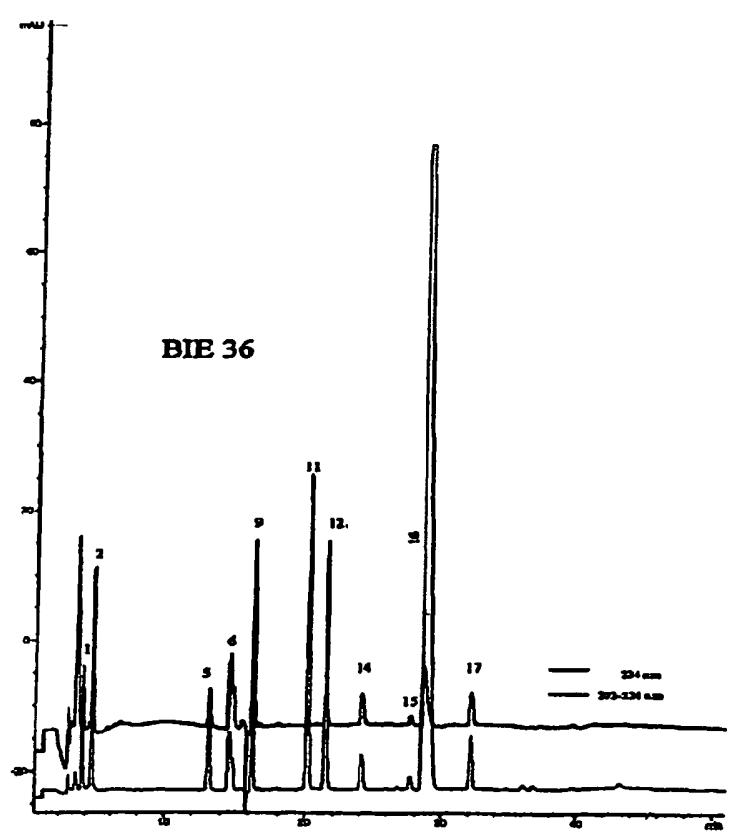


Figura 3

