

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201990005 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.06.28

(51) Int. Cl. *G01N 33/50* (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)
G01N 24/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.07.19

(54) СПОСОБ АНАЛИЗА ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ, ГЕПАРИНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ МЕТОДОМ ЯМР (ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА)

(31) 16382350.3

(32) 2016.07.19

(33) EP

(86) PCT/EP2017/068285

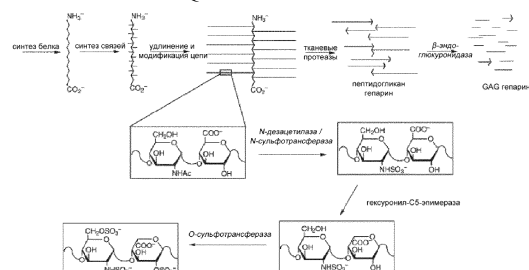
(87) WO 2018/015463 2018.01.25

(71) Заявитель:
ЛАБОРАТОРИОС
ФАРМАСЕУТИКОС РОВИ, С.А. (ES)

(72) Изобретатель:
Франко Гильермо, Гутьерро Ибон
(ES)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение описывает аналитический метод ядерного магнитного резонанса гликозаминогликанов в целом и гепаринов и низкомолекулярных гепаринов, а также их производных, в частности, что позволяет идентифицировать их и произвести относительное количественное определение их характерных сигналов с помощью ^1H ЯМР и ^1H - ^{13}C HSQC.



201990005

A1

A1

201990005

**СПОСОБ АНАЛИЗА ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ, ГЕПАРИНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ
МЕТОДОМ ЯМР (ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА)**

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение описывает способ анализа с применением ядерного магнитного резонанса (^1H ЯМР и ^1H - ^{13}C HSQC) для характеристики гликозаминогликанов в целом, и гепаринов и низкомолекулярных гепаринов, а также их производных, в частности; способ позволяет провести их количественный анализ.

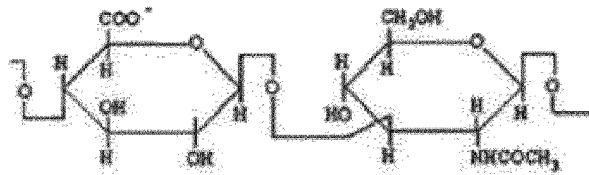
Предпосылки создания изобретения

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) является одной из наиболее важных и широко распространенных аналитических методик, используемых для определения характеристики гликозаминогликанов в целом, и гепаринов и низкомолекулярных гепаринов, а также их производных, в частности.

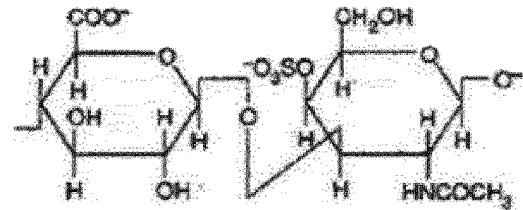
Возможность проведения как одномерных, так и двумерных экспериментов делает этот метод очень чувствительным при определении незначительных изменений в молекулярной структуре, что делает его предпочтительным способом определения соответственной характеристики этих соединений.

Гликозаминогликаны (GAG) представляют собой линейные и отрицательно заряженные полисахариды со средней молекулярной массой от 10 до 100 кДа (The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. Gandhi NS and Mancera RL. Chem Biol Drug Des 2008; 72:455-482). Существуют две крупные группы гликозаминогликанов: несulfатированные (как, например, гиалуроновая кислота) и sulfатированные (как, например, хондроитинсulfат, дерматансulfат, кератансulfат, гепарин и гепарансulfат). Цепи гликозаминогликанов образованы отдельными дисахаридами или соединениями дисахаридов, состоящими из уроновой кислоты (D-глюкуроновой кислоты или L-идуриновой кислоты) и аминсахара (D-галактозамин или D-глюкозамин).

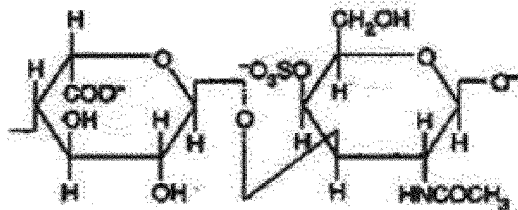
Гиалуроновая кислота:



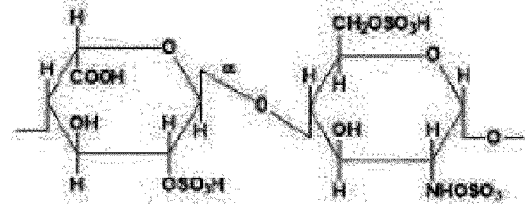
Хондроитинсульфат:



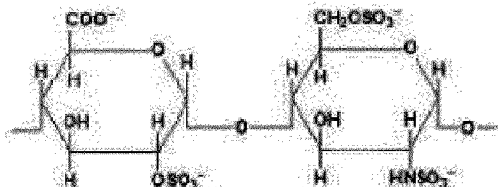
Дерматансульфат



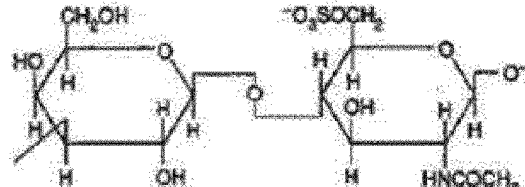
Гепарин



Гепарансульфат:



Кератансульфат:



Формула 1: Общая структура дисахаридной единицы для различных типов гликозаминогликанов

Гепарин представляет собой полисахарид семейства гликозаминогликанов, соединение уоновой кислоты (L-идурановой или D-глюкуроновой кислоты) и D-глюкозамина, связанных попеременно. L-идурановая кислота может быть 2-O-сульфатированной, а D-глюкозамин может быть N-сульфатированным и/или 6-O-сульфатированным и реже N-ацетилированным или 3-O-сульфатированным (Mapping and quantification of the major oligosaccharides component of heparin. Linhardt RJ, Rice KG, Kim YS et al. Biochem J 1988; 254:781-787). Основной повторяющейся единицей дисахарида является трисульфатированный дисахарид, 2-O-сульфо-L-идурановая кислота (1 $\rightarrow$ 4) 2-N-сульфо-6-O-сульфо-D-глюкозамин.

Происхождение этой структурной вариативности, присутствующей в цепях олигосахаридов гепарина, обнаруживается при их биосинтезе и в механизме регуляции биосинтеза. Так, на первой стадии биосинтеза тетрасахаридный фрагмент, образованный глюкозо-галактозо-галактозо-ксилозой, связывается с белковой сердцевиной,

начиная процесс биосинтеза гликопротеиновой цепи. Затем остатки глюкуроновой кислоты (GlcA) и остатки N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) попеременно объединяются, формируя полисахаридную цепь длиной приблизительно в 300 единиц. При этом происходит удлинение цепи, и под действием различных ферментов в ней происходят изменения. Таким образом, действие ферментов N-деацетилазы/N-сульфотрансферазы вызывает N-деацетилирование и N-сульфатирование блоков GlcNAc, превращая их в N-сульфоглюкозамин (GlcNS). C5-эпимераза катализирует трансформацию определенных единиц GlcA в идуроновую кислоту (IdoA), за чем следует 2-O-сульфатирование под воздействием 2-O-сульфотрансферазы. Далее, 6-O-сульфотрансфераза переносит 6-O-сульфогруппу на отдельные единицы GlcNS и GlcNAc. Наконец, 3-O-сульфотрансфераза действует на определенные единицы N-сульфо-6-O-сульфоглюкозамина (GlcNS6S), образуя остатки N-сульфо-3,6-ди-O-сульфоглюкозамина (GlcNS3S6S).

По-видимому, случайный и частичный характер начального N-деацетилирования в основном и отвечает за образование структурной гетерогенности в гепарине в первой фазе его биосинтеза. Структурная вариативность в отношении степени и положения сульфатирования является следствием частичного характера модификаций биосинтетических ферментов, которые приводят к выработке молекул гепарин натрия с переменной моделью замещения дисахаридов.

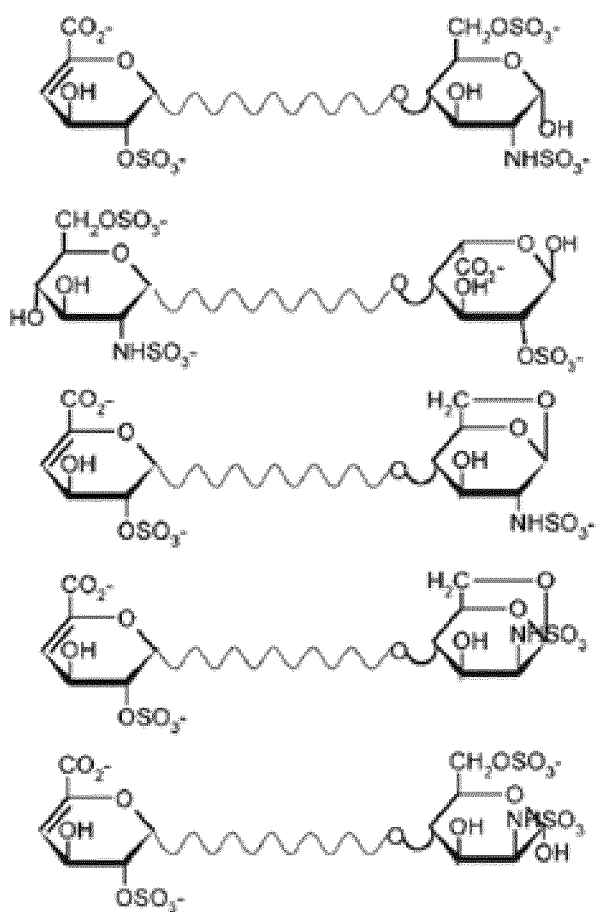
Гепарин предпочтительно используется в качестве натриевой соли, но его также можно использовать в качестве соли других щелочных или щелочноземельных металлов, и в основном он используется в антитромботической и антикоагулянтной медицине (Anticoagulant therapy for major arterial and venous thromboembolism. Tran HAM, Ginsberg JS. Basic principles and clinical practice. Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ (Ред.). Lippincott Williams and Wilkins; 2006:1673-1688).

Гепарины можно классифицировать в зависимости от их молекулярной массы, а именно: нефракционированный гепарин (UFH), низкомолекулярный гепарин (LMWH) со средней молекулярной массой менее 8000 Да и ультранизкомолекулярный гепарин (ULMWH) со средней

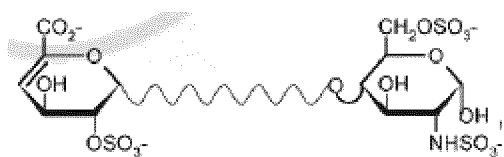
молекулярной массой менее 3000 Да (Chemoenzymatic synthesis of homogenous ultra low molecular weight heparins. Xu Y. et al. Science 2011; 334: 498-501). LMWH и ULMWH происходят от деполимеризации исходной молекулы UFH, и процесс ее получения может вводить определенные характеристики в структуру молекулы. Таким образом, полученная структура молекулы происходит, с одной стороны, из-за структуры гепарина, используемого в качестве исходного материала, а с другой стороны - из-за характерных остатков, генерируемых и свойственных используемому способу получения.

Процесс получения эноксапарин натрия (β -элиминация бензилового эфира гепарина в водной среде под действием щелочи) и бемипарин натрия (β -элиминация в безводной среде под действием щелочи) генерирует на концах большинства видов соединений 4,5-ненасыщенную 2-О-сульфоуроновую кислоту (Δ U2S) на невозстанавливаемом конце и 2-Н-сульфо-6-О-сульфоглюкозамин на восстанавливаемом конце молекулы. Кроме того, невозстанавливающий конец может иметь структуры 4,5-ненасыщенной 2-О-уроновой кислоты (Δ U). На восстанавливаемом конце вышеупомянутого остатка можно найти 2-Н-сульфо-6-О-сульфоманнозамин (щелочная обработка катализирует эпимеризацию в C2) в дополнение к другим двум видам 1,6-ангидропроизводных: 2-Н-сульфо-1,6-ангидроглюкозамин (1,6-an.A) и 2-Н-сульфо-1,6-ангидроманнозамин (1,6-an.M).

Формула 2: Структуры, присутствующие на восстанавливаемом и невозстанавливаемом концах в эноксапарин и бемипарин натрия.

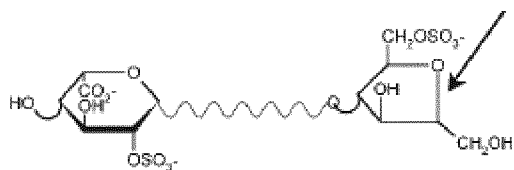


В процессе получения в других низкомолекулярных гепаринах также образуются остатки. Например, на невосстанавливаемом конце тинзапарин натрия, который получают методом β -элиминации путем обработки гепариназами, присутствует 4,5-ненасыщенная 2-О-сульфоуроновая кислота ($\Delta U2S$).



Формула 3: Структуры, присутствующие на восстанавливаемом и невосстанавливаемом концах в тинзапарин натрия

Дальтепарин натрия получают путем обработки азотистой кислотой, которая образует остаток 2,5-ангидроманнитола на восстанавливаемом конце молекулы.



Формула 4: Структуры, присутствующие на восстанавливаемом и

невосстанавливаемом концах в дальтпарин натрии

В настоящем описании «моносахаридный остаток, присутствующий в цепях гепарина» означает те моносахаридные остатки или компоненты, которые обычно присутствуют в цепях LMWH/UFH/GAG. Список этих остатков включает 4,5-ненасыщенную 2-О-сульфоуроновую кислоту (Δ U2S), 4,5-ненасыщенную уоновую кислоту (Δ U), 2-N-сульфо-1,6-ангидроглюкозамин (1,6-an.A), 2-N-сульфо-1,6-ангидроманнозамин (1,6-an.M), 2-N-сульфо-6-О-сульфоглюкозамин (ANS6S), 2,5-ангидроманнит, N-сульфоглюкозамин, глюкуроновую кислоту, N-сульфо-6-О-сульфоглюкозамин, 2-О-сульфоидуроновую кислоту, идуроновую кислоту, N-сульфо-3-О-сульфоглюкозамин, N-сульфо-3,6-ди-О-сульфоглюкозамин, галактуроновую кислоту, ксилозу, N-ацетилглюкозамин и N-ацетил-6-О-сульфоглюкозамин.

ЯМР-спектроскопия позволяет идентифицировать остатки, типичные для процессов получения гепарина и низкомолекулярного гепарина.

Одним из преимуществ использования ЯМР для структурной характеристики является то, что для его анализа образцы не требуют предварительных дериватизаций или хроматографического фракционирования. Другими словами, образец непосредственно анализируют с помощью ЯМР без необходимости проведения промежуточных обработок.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса используется для определения последовательности моносахаридных остатков, присутствующих в этих соединениях, и однозначно определяет точки N-ацетилирования и N- и O-сульфатирования по всей олигосахаридной цепи. Кроме того, этот метод позволяет конкретно определить ориентацию аномерных связей и провести различие между идуроновой кислотой и эпимерами глюкуроновой кислоты. (Advancing Analytical Methods for Characterization of Anionic Carbohydrate Biopolymers. Langeslay D.J. PhD Thesis UC Riverside 2013). Однако, учитывая высокую степень микрогетерогенности и полидисперсности этих соединений, комплексная характеристика гепаринов и низкомолекулярных гепаринов в настоящее время остается проблемой.

Кроме того, этот метод может быть использован для получения

информации о тех структурных остатках, которые образуются в процессе получения гепаринов и низкомолекулярных гепаринов, как например, состояние эпимеризации уроновых кислот (идурановая кислота против глюкуроновой кислоты), соотношение сульфатированных и несulfатированных 4,5-уронатных остатков на невосстанавливаемом конце (для низкомолекулярных гепаринов, продуцируемых методом β -элиминации или путем обработки гепариназами).

Аналогично, и благодаря своей высокой чувствительности, этот метод использовался в качестве метода скрининга для определения примесей, присутствующих в гликозаминогликанах (Analysis and characterization of heparin impurities. Beni S. et al. Anal Bioanal Chem 2011, 399:527-539).

Последним достижением науки было раскрытие различных методов и экспериментов с применением ЯМР для структурной характеристики гликозаминогликанов в целом, а также гепаринов и низкомолекулярных гепаринов, в частности. Так, например, ^{13}C -ЯМР-спектроскопия была использована для определения степени сульфатирования в гепарин натрия различного животного происхождения (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).

^1H -ЯМР-спектроскопия была наиболее широко используемой методикой для изучения этих соединений, поскольку она задействует большое количество ядер и имеет высокое гироманнитное отношение. Диапазон от 1,8 до 2,1 м.д. содержит сигналы, соответствующие N-ацетильным группам или метильным группам восстанавливающих концов, которые могут быть синтезированы. Диапазон от 2,8 до 4,6 м.д. содержит большинство сигналов сахаридного кольца и имеет высокую степень наложения между сигналами, что затрудняет извлечение структурной информации непосредственно из этой области. В диапазоне от 4,6 до 6,0 м.д. – это сигналы, соответствующие аномерным протонам. Так как это область, которая имеет намного меньшую заполненность сигналами, из нее можно извлечь много информации. Кроме того, в

случае LMWH, полученных с использованием механизма β -элиминации, она также содержит сигналы, соответствующие H4 на невосстанавливающих концах молекулы.

Двумерные эксперименты (2D ЯМР) позволяют преодолеть проблемы одномерных экспериментов, в основном благодаря наложению сигналов, а также тому, что спектры имеют два частотных измерения и другую интенсивность сигнала, что позволяет им стать мощным инструментом для обозначения олигосахаридных структур, полученных из гепарина (Characterization of currently marketed heparin products: composition analysis by 2D-NMR. Keire D.A. et al. Anal. Methods 2013.5:2984-2994).

Спектры TOCSY (Total Correlation Spectroscopy, полная корреляционная спектроскопия) являются отличной отправной точкой для структурного анализа олигосахаридов, поскольку полученная в результате информация позволяет сопоставить ядра, найденные в одной и той же спиновой системе, а в этом случае все протоны в одном и том же моносахариде.

Другим двумерным экспериментом, имеющим особое значение для структурной характеристики этого типа соединений, является ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation, гетероядерная одноквантовая корреляция), которая коррелирует химические сдвиги протонов с химическими сдвигами углерода ^{13}C и позволяет назначать первичные структуры олигосахаридов, полученных из GAG и моносахаридного состава (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).

Увеличение спектральной дисперсии, достигаемое с помощью этого двумерного метода, позволяет количественно определять интегралы сигналов, которые накладываются в соответствующие одномерные спектры (Low-molecular-weight heparins: structural differentiation by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. Guerrini M. et al. Semin Thromb Hemost

2007.33:478-487).

Метод ядерного магнитного резонанса, по определению, представляет собой метод количественной спектроскопии, поскольку интенсивность резонансных линий прямо пропорциональна числу резонансных ядер (спинов). Это теоретически позволяет с точностью определить количество молекулярных структур.

Увеличение интенсивности магнитных полей, используемых в ЯМР, позволило значительно снизить пределы обнаружения. Однако отсутствие точных методик, которые рассматривают и контролируют как экспериментальные способы, так и обработку и оценку спектров, означает, что измерения, проведенные на идентичных образцах в различных лабораториях, могут существенно отличаться (Validation of quantitative NMR. Malz F. and Jancke H. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2005.38:813-823).

Сложность спектров ядерного магнитного резонанса гликозаминогликанов в целом, и гепаринов и низкомолекулярных гепаринов, а также их производных, в частности, означала, что до настоящего времени не были разработаны специальные методы валидации, которые позволяют количественно определять его характерные сигналы, и, следовательно, подходящую характеристику и дифференциацию этих соединений.

Следовательно, авторы настоящего изобретения смогли преодолеть это препятствие современной науки, сумев разработать способ, который позволяет однозначно дифференцировать гепарины друг от друга. Благодаря способу, разработанному в рамках настоящего изобретения, процентные значения полученного моносакхаридного состава позволяют дифференцировать низкомолекулярные гепарины, полученные в ходе различных процессов, а также гепарин натрия и другие гликозаминогликаны.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения разработали способ, который позволяет количественно определять характерные сигналы гликозаминогликанов в целом, и гепаринов и низкомолекулярных гепаринов, а также их производных, в частности, с использованием одномерного ядерного магнитного резонанса ^1H ЯМР и/или двумерного ядерного магнитного резонанса ^1H - ^{13}C HSQC. Количественное

определение этих сигналов позволяет определить моносакхаридный состав олигосакхаридных цепей каждого из этих соединений, что является характерной особенностью для соединения.

Следовательно, в отношении первого аспекта изобретение обеспечивает способ анализа состава, содержащего моносакхаридные остатки, присутствующие в цепях гепарина или выходящие из них, с помощью одномерного ядерного магнитного резонанса ^1H ЯМР и/или двумерного ядерного магнитного резонанса ^1H - ^{13}C HSQC, который состоит из следующих этапов:

а) Получение состава, включающего, по меньшей мере, один моносакхаридный остаток, присутствующий в цепях гепарина, и получение его спектра путем одномерного ядерного магнитного резонанса ^1H ЯМР и/или двумерного ядерного магнитного резонанса ^1H - ^{13}C HSQC с использованием диметилмалоновой кислоты (DMMA) в качестве внутреннего эталона, и затем

б) Выявление в спектре ЯМР факта присутствия или отсутствия как минимум одного сигнала как минимум одного остатка, выбранного из группы, состоящей из: 4,5-ненасыщенной 2-О-сульфоуроновой кислоты (ΔU2S), 4,5-ненасыщенной уроновой кислоты (ΔU), 2-N-сульфо-1,6-ангидроглюкозамина (1,6-an.A), 2-N-сульфо-1,6-ангидроманнозамина (1,6-an.M), 2-N-сульфо-6-О-сульфоглюкозамина (ANS6S), 2,5-ангидроманнита, N-сульфоглюкозамина, глюкуроновой кислоты, N-сульфо-6-О-сульфоглюкозамина, 2-О-сульфоидуроновой кислоты, идуроновой кислоты, N-сульфо-3-О-сульфоглюкозамина, N-сульфо-3,6-ди-О-сульфоглюкозамина, галактуроновой кислоты, ксилозы, N-ацетилглюкозамина и N-ацетил-6-О-сульфоглюкозамина,

отличающегося тем, что наличие указанных сигналов в определенной относительной пропорции ее нормализованных интегралов по отношению к DMMA или их отсутствие составляет образец, который позволяет идентифицировать гепарин, который представляет собой моносакхаридный остаток, путем сравнения модели, полученной в анализе, с эталоном, ранее полученным для разных гепаринов при тех же условиях.

Подходящая количественная оценка характерных сигналов этих

продуктов и их моносакхаридного состава или характерных остатков позволяет соответствующим образом дифференцировать полисахариды друг от друга и определить их происхождение, а в случае низкомолекулярных гепаринов – подтвердить, что продукты были изготовлены в соответствии с заявленным способом.

Это количественное определение остатков измеряется в процентах и в относительной форме по отношению к полной структуре каждого гепарина. Получение характерной «картины» каждой из структур, которая позволяет однозначно выводить и идентифицировать как анализируемый гепарин, так и процесс, посредством которого он был получен. Таким образом, способ по настоящему изобретению может использоваться как в качестве системы или методики контроля качества (для оценки того, соответствуют ли анализируемые гепарины определенному эталону или фальсифицированы), так и в качестве метода анализа и определения характерных сигналов новых структур гепарина, для которых впоследствии этот же способ может использоваться как система или методика контроля качества.

Кроме того, одобрение со стороны органов здравоохранения биосимиларов и/или дженериков некоторых низкомолекулярных гепаринов, как и в случае с эноксапарин натрием, происходит после надлежащим образом выполненного сопоставления между биосимиларом/дженериком и эталонной молекулой, которое должно продемонстрировать, среди прочих аспектов, подходящую степень структурного сходства между обоими продуктами. Одним из основных аспектов структурного уровня, который необходимо продемонстрировать, является то, что относительная доля моносакхаридов, которые образуют свои олигосахаридные цепи, после статистической оценки соответствуют критериям биоподобия. Для них способ по настоящему изобретению является особенно селективным.

Авторы настоящего изобретения подтвердили, что, хотя структурная характеристика с помощью ядерного магнитного резонанса широко используется для характеристики этих соединений, однако в литературе нет методов количественного анализа гликозаминогликана с помощью ЯМР. Отсутствие этих методов препятствует надлежащей сопоставимости между идентичными образцами, которые были изучены и оценены в условиях, не соответствующих установленным экспериментальным условиям.

Таким образом, в литературных публикациях можно найти, что значения относительной пропорции, которые предоставляются для различных остатков компонентов этих соединений, значительно отличаются друг от друга, что ясно указывает на то, что они являются недостаточно корректными методами (Generic 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. and Mourao P.A.S. J Thromb Haemost 2011.9;1419-1422).

С целью создания селективного количественного способа определения доли сигналов, соответствующих остаткам, присутствующим в структуре этих соединений, что позволяет провести надлежащее сопоставление результатов и позволяет избежать ошибки, вызванной условиями, в которых ЯМР-эксперименты выполняются, авторы изобретения обнаружили, что использование диметилмалоновой кислоты (DMMA) в качестве внутреннего эталона в экспериментах ^1H ЯМР и HSQC для относительной количественной оценки сигналов, которые соответствуют разным компонентным моносахаридам, является подходящим, поскольку, среди других аспектов, время продольной релаксации (T_1) составляет менее 1 секунды, аналогично T_1 аномерных протонов и углеродов (Molecular Weight of Heparin using ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Desai U.R. and Linhardt R.J., J Pharm Sci 1995.84(2);212-215), что позволяет хорошо переносить поляризацию и, следовательно, увеличивать интенсивность сигналов, что делает способ пригодным для этой цели.

Таким образом, процесс ЯМР-анализа этих соединений характеризуется, в первую очередь, использованием диметилмалоновой кислоты в качестве внутреннего эталона для количественного определения характерных сигналов этих продуктов, как с использованием ^1H ЯМР, так и ^1H - ^{13}C HSQC.

Неожиданно было обнаружено, что селекция диметилмалоновой кислоты (DMMA) в качестве внутреннего эталона при ее применении как для ^1H ЯМР, так и для ^1H - ^{13}C HSQC, позволяет количественно определять процентное значение характерных сигналов в гликозаминогликанах, обычно связанных с гепаринами, с высокой специфичностью, точностью, повторяемостью и линейностью, а также

между сигналом спектра ЯМР и концентрацией характерных остатков анализируемого гликозаминогликана, что позволяет разработать способ количественного анализа указанных гликозаминогликанов, которого не существует на сегодняшний день.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Рисунок 1: Диаграмма процесса биосинтеза гепарина

Рисунок 2: Специфичность. ^1H ЯМР-спектры

Рисунок 3: Специфичность. ^1H - ^{13}C HSQC-спектры

Рисунок 4: ^1H ЯМР линейность

Рисунок 5: ^1H - ^{13}C HSQC линейность

Рисунок 6: ^1H ЯМР-спектр эноксапарин натрия

Рисунок 7: ^1H - ^{13}C HSQC-спектр эноксапарин натрия

АББРЕВИАТУРЫ И АКРОНИМЫ

В настоящей спецификации используются следующие аббревиатуры и акронимы:

ЯМР: Ядерный магнитный резонанс

HSQC: Гетероядерная одноквантовая корреляция

GAG: Гликозаминогликан

UFH: Нефракционированный гепарин

LMWH: Низкомолекулярный гепарин

ULMWH: Ультранизкомолекулярный гепарин

Да: Дальтон

ΔU2S : 4,5-ненасыщенная 2-О-сульфоуроновая кислота

ΔU : 4,5-ненасыщенная уроновая кислота

1,6-an.A: 2-N-сульфо-1,6-ангидроглюкозамин

1,6-an.M: 2-N-сульфо-1,6-ангидроманнозамин

TOCSY: Полная корреляционная спектроскопия

TSP: 3-(триметилсилил)пропионовая кислота-d4 натриевая соль

DMMA: Диметилмалоновая кислота

МГц: Мегагерц

м.д.: Миллионная доля

δ : Химический сдвиг

SW: Спектральная ширина

TD: Промежуток времени

T1: Время продольной релаксации

ANS: N-сульфоглюкозамин

G: Глюкуроновая кислота

ANS6S: N-сульфо-6-O-сульфоглюкозамин

I2S: 2-O-сульфоидуруновая кислота

I: Идуруновая кислота

ANS3S: N-сульфо-3-O-сульфоглюкозамин

Gal: Галактуруновая кислота

Xyl: Ксилоза

ANAc: N-ацетилглюкозамин

A6S: 6-O-сульфоглюкозамин

A6OH: Глюкозамин

G2S: Сульфотуруруновая 2-O кислота

M: Маннозамин

MNS6S: N-сульфо-6-O-сульфоманнозамин

Epoх: Эпоксид

α red: α -аномер

β red: β -аномер

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Экспериментальные испытания

Количественные ЯМР-испытания были выполнены с использованием спектрометра ядерного магнитного резонанса (ЯМР) фирмы Bruker AVIII-600 о AVIII-800. В качестве внутреннего эталона использовали следующие реагенты: оксид дейтерия (D_2O) 99,9%, 3-(триметилсилил) пропионовая кислота-d4 натриевая соль (TSP) и диметилмалоновая кислота (DMMA, эталон для количественного ЯМР, степень чистоты TraceCERT).

а) Инструментальные настройки

- Частота: 1H : 600/800 МГц, ^{13}C : 150,9/201,2 МГц
- Температура: 298 К

б) Параметры поглощения (количественный 1H ЯМР)

- 90° импульс: определяется из качественного 1H -спектра
- Диапазон поглощения: $SW=10-12$ м.д./ $TD=64-128k$
- Задержка интервала сканирования $d1$ должна удовлетворять условию $d1+AQ \geq 20$ с
- Количество сканирований: 12

с) Параметры поглощения (HSQC)

90° импульс: определяется из качественного ^1H -спектра

Диапазон поглощения: SW2 (^1H)=6 м.д./TD(F2)=1k

SW1 (^{13}C)=120 м.д./TD(F1)=256-384

Время между импульсами d1=1,8-2 с

Количество сканирований: 12

d) Параметры обработки (^1H)

Интервал обработки: SI=64-256K

Функция-окно: Отсутствует

Регулировка фазы: ручная

Исходная настройка: автоматическая (abs)

e) Параметры обработки (HSQC)

Интервал обработки: SI(F2)=2k

Функция обработки: QSINE, SSB=2

Регулировка фазы: ручная

Исходная настройка: автоматическая

f) Для приготовления образца готовят следующие растворы:

– Раствор А [TSP] 1 мг/мл

Раствор В [D2O-TSP] 0,002 мг/мл: 40 мкл А [TSP]+19,96 мл D2O,
Общий объем=20 мл

Раствор С [DMMA] 1,2 мг/ мл

Испытательный образец: 50 мг исследуемого продукта помещают в 500 мкл раствора В [D2O-TSP] и добавляют 100 мкл раствора С [DMMA] диметилмалоновой кислоты и помещают в пробирку для ЯМР диаметром 5 мм.

g) Процесс

ЯМР-пробирку, содержащую образец, вводят в спектрометр. Затем регулируют однородность магнитного поля и гармонию волны оптимизируют для ядер ^1H и ^{13}C . Затем выполняется качественный ^1H -спектр с параметрами, аналогичными указанным выше, за исключением следующего:

Время между импульсами d1=1-2 с

Количество сканирований: 1-4

Затем значение импульса 90° определяется с помощью автоматической импульсной программы (TOPSPIN). Затем выполняется

количественный ^1H -спектр с параметрами, указанными в аналитическом методе, со значением импульса 90° (P1), которое было определено ранее. После получают спектр HSQC с указанными выше параметрами. Полученные спектры затем обрабатывают в соответствии с вышеупомянутыми параметрами, принимая в качестве эталона химического сдвига сигнал TSP-d4 при 0 м.д.

Сигнал диметилмалоновой кислоты появляется при следующих химических сдвигах:

^1H ЯМР: синглет, который появляется при 1,2-1,4 м.д.

HSQC: сигнал при 1,2-1,4 и 26-27 м.д.

Параметры, подлежащие оценке при определении валидации метода для количественного ЯМР, были следующими:

Специфичность

С определенностью устанавливает пригодность аналитического метода для измерения и/или идентификации интересующих аналитов одновременно или по отдельности в присутствии других химических веществ, которые могут присутствовать в образце.

Данные, полученные в спектрах ^1H ЯМР в ходе этих экспериментов, были следующими:

Образец	Состав	Химический сдвиг, м.д.
I, растворитель	D_2O	4,79
II, эталон химического сдвига	D_2O -TSP	0,00
III, внутренний эталон	D_2O -DMMA	1,42
IV, образец GAG	D_2O -TSP-DMMA-GAG	1,8-8,0

И в ^1H ^{13}C -HSQC спектрах:

Образец	Состав	Химический сдвиг ^1H , м.д.	Химический сдвиг ^{13}C , м.д.
III, внутренний эталон	D_2O -DMMA	1,42	25,42
IV, образец: GAG	D_2O -TSP-DMMA-GAG	1,8-8,0	24-112

Проверяется отсутствие помех между сигналами как в спектрах ^1H ЯМР, так и в ^1H ^{13}C -HSQC (Рис. 2 и 3). Это демонстрирует, что в способе возможно без помех различать сигналы, формирующие

структуру исследуемого соединения, и сигналы других продуктов, присутствующих в образце, таких как растворитель (оксид дейтерия, D_2O), внутренний эталон (диметилмалоновая кислота, DMMA) и эталонный химический сдвиг (TSP-d4).

Предел количественной оценки и линейность

В соответствии с этими параметрами определяется, с одной стороны, минимальное количество аналита, которое может быть точно и безошибочно определено количественно, а с другой стороны, способность способа получать результаты в прямой пропорциональности (посредством математических преобразований) к концентрации аналита в образце в пределах установленного интервала.

Для установления предела количественной оценки и линейности количественно подсчитывают интегралы ЯМР-сигналов DMMA (т. е. интеграл области сигнала ЯМР, соответствующей DMMA) на эноксапарин натрия, легированном на 7 уровнях концентрации внутреннего эталона, путем независимых взвешиваний трех экземпляров. Эти уровни соответствуют следующим рабочим концентрациям:

- 0,2 мМ: 13,5% рабочей концентрации
- 0,3 мМ: 20,3% рабочей концентрации
- 0,76 мМ: 50% рабочей концентрации
- 1,2 мМ: 80,1% рабочей концентрации
- 1,5 мМ: 100% рабочей концентрации
- 1,8 мМ: 120% рабочей концентрации
- 2,27 мМ: 150,2% рабочей концентрации

Критерии приемлемости, установленные для выполнения этого критерия линейности, заключаются в том, что в полученной линии коэффициент корреляции для обоих экспериментов составляет $\geq 0,99$. На рисунках 4 и 5 графически представлены интегральные значения сигнала DMMA в зависимости от концентраций DMMA (мМ) для спектров 1H ЯМР и 1H ^{13}C -HSQC. Критерий приемлемости легко выполняется для обоих спектров.

Предел количественной оценки устанавливается для концентрации DMMA в 0,20 мМ. Таким образом, сигналы образцов, исследованных с интенсивностью, меньшей, чем интенсивность сигнала DMMA,

соответствующего этой концентрации, не могут быть соответственно количественно определены и, следовательно, они не могут быть использованы для определения относительной доли остатков, присутствующих в молекуле.

Точность

Способ выражает близость между значением, которое принимается обычно в качестве истинного или эталонного значения, и найденным экспериментальным значением. Для расчета и оценки экспериментального значения концентрации образцов в способе сравнивают уравнения с линией, полученной в предыдущем разделе (линейность).

Точность выражается как процент восстановления при оценке известного количества внутреннего эталона:

$$\text{Процент восстановления (R)} = \frac{X_m}{\mu} \times 100$$

Где:

X_m : найденное среднее значение

μ : значение, принятое как истинное

Установленные критерии приемлемости заключаются в том, что значения восстановления составляют от 70,0 до 130,0% для концентрации, соответствующей пределу концентрации, и от 80,0 до 120,0% для других уровней.

Данные, полученные для экспериментов ^1H NMR и HSQC, были следующими:

a) ^1H ЯМР

Концентрация, мМ	Конц. вычисленная, мМ	Восстановление, ^1H ЯМР
0,204	0,228	111,77
0,307	0,330	107,31
0,758	0,737	97,26
1,212	1,175	96,90
1,514	1,488	98,29
1,817	1,810	99,65
2,274	2,318	101,94

b) HSQC

Концентрация, мМ	Конц. вычисленная, мМ	Восстановление, 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
1,514	1,488	98,29
1,817	1,823	100,32
2,274	2,328	102,37

Вывод, сделанный из этого анализа как для эксперимента ^1H ЯМР, так и для HSQC, в соответствии с критериями приемлемости подтверждает пригодность параметров точности для тех сигналов, которые соответствуют образцу, с интенсивностью, превышающей интенсивность предела количественной оценки.

Точность – Повторяемость

Вариабельность метода изучается путем проведения серии анализов на одном и том же образце в одних и тех же условиях работы в одной и той же лаборатории и за короткий период времени.

Для этого для каждой концентрации проводили три последовательных анализа. Повторяемость метода выражается как коэффициент вариации (CV) серии измерений и математически рассчитывается следующим образом:

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

Где:

s: стандартное отклонение

X: среднее арифметическое для результатов.

Критерии приемлемости, установленные для выполнения этих критериев точности, заключаются в том, что коэффициент вариации для всех уровней составляет $\leq 7\%$.

Данные, полученные для обоих экспериментов, были следующими:

Концентрация, мМ	CV, % ^1H ЯМР	CV, % HSQC
0,204	5,55	3,40
0,307	0,09	2,29
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

Вывод, сделанный из этого анализа как для эксперимента ^1H ЯМР, так и для HSQC, в соответствии с критериями приемлемости подтверждает пригодность параметров точности для тех сигналов, которые соответствуют образцу, с интенсивностью, превышающей интенсивность предела количественной оценки.

ПРИМЕРЫ

Ниже приведенные конкретные примеры служат для иллюстрации характера настоящего изобретения. Эти примеры включены только для иллюстративных целей и не должны интерпретироваться как какие-либо заявленные ограничения изобретения.

ПРИМЕР 1

Исследование эноксапарин натрия методом ^1H ЯМР.

50 мг эноксапарин натрия растворяют в 500 мкл раствора D_2O -TSP (раствор В) и добавляют 100 мкл раствора DMMA (раствор С). Полученный раствор вводят в пробирку диаметром 5 мм.

Полученная концентрация DMMA в растворе для анализа составляет 1,5 мМ.

Эксперименты проводятся в ЯМР-спектрометре фирмы Bruker AVIII-800.

Основные идентифицированные сигналы:

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Сигнал	Химический сдвиг, м.д.
H4 $\Delta\text{U}2\text{S}$	5,992	H1 G	4,628
H4 $\Delta\text{U}2$	5,825	H6 ANS6S	4,344
H1 1,6-An.A	5,616	H6' ANS6S	4,210
H1 ANS(-G)	5,585	H3 ANS	3,670
H1 1,6-An.M	5,569	H2 ANS3S	3,395
H1 $\Delta\text{U}2\text{S}$	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		

После того, как были получены значения интегралов сигналов как DMMA, так и остальной части остатков, получают нормализованные

значения упомянутых остатков путем деления значения его интегралов на значение интеграла, соответствующего сигналу DMMA. Эта нормализация может быть выполнена, поскольку концентрация внутреннего эталона поддерживается постоянной по отношению к концентрации остатка для всех экспериментов, что позволяет избежать межэкспериментальной вариабельности, которая может возникнуть при анализе серии из нескольких партий продуктов.

Как только нормализованные значения остатков будут получены, относительный процент каждого из них рассчитывается в соответствии со следующей формулой:

$$\% \text{ сигнал } X = \frac{\text{нормализованное значение сигнала } X}{\sum \text{ нормализованное значение всех сигналов}} \times 100$$

Для уточнения выполненных шагов полученные результаты показаны для серии из четырех образцов M1, M2, M3 и M4 эноксапарин натрия:

В проведенных экспериментах были получены следующие интегральные значения для каждого из выбранных сигналов:

Сигнал	Интеграл			
	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
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
NAc	8054931.36	7973188.48	8124533.56	6388424.34
DMMA	1464255.27	1415020.17	1485242.95	1279612.94

где M соответствует образцу.

Чтобы получить нормализованные значения интегралов исследуемых сигналов, они делятся на значение интеграла DMMA:

Сигнал	Нормализованный интеграл			
	M 1	M 2	M 3	M 4
H4 Δ U2S	1.890	2.112	2.071	1.823
H4 Δ U	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 Δ U2S	2.419	2.698	2.660	2.344
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
DMMA	1.000	1.000	1.000	1.000

И, наконец, из этих нормализованных значений рассчитывается относительная доля каждого из этих сигналов к совокупности всех сигналов:

Сигнал	Относительная доля, %			
	M 1	M 2	M 3	M 4
H4 Δ U2S	4.47	4.64	4.66	4.57
H4 Δ U	0.18	0.21	0.22	0.18
H1 1,6-an.A	0.65	0.73	0.77	0.69
H1 1,6-an.M	4.09	4.20	4.31	4.23
H1 Δ U2S	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
H2 ANS	26.39	26.11	25.83	25.83
NAc	13.00	12.39	12.31	12.51

Количественное определение характерных и хорошо дифференцированных сигналов эноксапарин натрия (как правило, соответствующих аномерным протонам, H1) показано в следующей таблице с наблюдаемыми значениями относительной долевой пропорции:

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Относительная доля, %
H4 Δ U2S	5,99	4,3–4,7

H4 ΔU	5,82	0,2
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
H5 I2S	4,84	14,3-16,3
H2 ANS	3,29	24,3-26,6
NAc	2,05	12,0-15,3

Набор сигналов, соответствующих пикам, найденным в определенном спектре ЯМР, будь то одномерный ^1H ЯМР и/или двумерный ^1H - ^{13}C HSQC, или их отсутствие в относительных пропорциях его нормализованных интегралов, обозначенных параметром «относительная доля (%)» – это то, что в настоящей спецификации называется «модель сигнала» или просто «модель».

ПРИМЕР 2

Такое же решение, используемое в примере 1, используется для проведения исследования с использованием ^1H - ^{13}C HSQC. Основные идентифицированные сигналы:

Сигнал	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.	Сигнал	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.
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 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 Δ U	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
C1-H1 I2S	102.09	5.22	C6-H6 1,6-an.A//	67.53	3.77
			1,6-an.M		
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 Δ U2S	65.75	4.32
C1-H1 Δ U2S	100.18	5.51	C6-H6 Gal	63.90	3.74
C1-H1 ANS(-I2S)	99.78	5.40	C2-H2 ANS6S red//	60.82	3.28
			ANS(-I2S)		
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
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
C1-H1 ANS α red//	93.97	5.45			
ANS6S red					

Эти сигналы могут быть ассоциированы с моносахаридными компонентами молекулы, так что количественное определение сигналов позволяет определить их моносахаридный состав.

Интегралы для каждого из этих сигналов были нормализованы, исходя из значения, установленного для интеграла DMMA, используя тот же процесс, который был описан для экспериментов с использованием ^1H ЯМР. Количественное определение характерных сигналов эноксапарин натрия показано в следующей таблице:

Сигнал	Относительная доля, %
C1-H1 ANS-I2S	25,6-26,9
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- α red	< LC

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- α red	1,0-1,3
C1-H1 I2S	24,5-27,5
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
C1-H1 G2S	1,1-1,6
C1-H1 Δ U2S	11,5-12,4
C1-H1 Δ U	0,3-0,5
C1-H1 I2S-red	1,0-1,4
C5-H5 Gal-A	< LC-0,5
Erox	< LC-0,4

Эти эксперименты показывают, что, используя описанные выше экспериментальные условия, с помощью ядерного магнитного резонанса (^1H ЯМР и ^1H - ^{13}C HSQC) можно создать способ анализа гликозаминогликанов в целом и гепаринов и низкомолекулярных гепаринов, а также их производных, в частности, что позволяет проводить их количественный анализ.

ПРИМЕР 3

Исследование бемипарин натрия методом ^1H ЯМР.

Основные идентифицированные сигналы:

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Сигнал	Химический сдвиг, м.д.
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
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		

Количественное определение характерных и хорошо дифференцированных сигналов бемипарин натрия (как правило, соответствующих аномерным протонам, H1) показано в следующей таблице с наблюдаемыми значениями относительной долевой пропорции для серии из шести образцов.

ПРИМЕР 4

Такое же решение, используемое в примере 3, используется для проведения исследования с использованием ^1H - ^{13}C HSQC. Основные идентифицированные сигналы:

Сигнал	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.	Сигнал	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.
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)// ANS6S red	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 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
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
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
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
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
C1-H1 ANS αred // ANS6S red	93.97	5.45			
ANS6S red					

Эти сигналы могут быть ассоциированы с моносакхаридными компонентами молекулы, так что количественное определение сигналов позволяет определить ее моносакхаридный состав.

Интегралы каждого из этих сигналов были нормализованы, начиная со значения, установленного для интеграла DMMA, используя ту же процедуру, которая была описана для экспериментов с использованием ^1H ЯМР. Количественное определение характеристики сигналов бемипарин натрия показано в следующей таблице:

Сигнал	Относительная доля, %
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
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
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
C1-H1 G-ANS	1,9-3,6
C1-H1 G-ANAc	0,4-1,4
C1-H1 G2S	< 0,5
C1-H1 Δ U2S	10,9-14,9
C1-H1 Δ U	0,6-1,6
C1-H1 I2S-red	< 0,5
C5-H5 Gal-A	< 0,3

ПРИМЕР 5

Исследование дальтепарин натрия методом ^1H ЯМР.

Основные идентифицированные сигналы:

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Сигнал	Химический сдвиг, м.д.
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
H5 I2S	4.836	DMMA	1.320
H1 G	4.628	TSP	0.069
H6 ANS6S	4.344		

Количественное определение характерных и хорошо дифференцированных сигналов дальтепарин натрия (как правило, соответствующих аномерным протонам, H1) показано в следующей таблице с наблюдаемыми значениями относительной долевой пропорции для серии из шести образцов.

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Относительная доля, %
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

ПРИМЕР 6

Такое же решение, используемое в примере 5, используется для проведения исследования с использованием ^1H - ^{13}C HSQC. Основные идентифицированные сигналы:

Сигнал	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.	Сигнал	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.
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
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
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
C3-H3 Gal	85.45	3.78	DMMA	26.73	1.32
C3-H3 Gal	84.85	3.83	NAc	24.87	2.05

Эти сигналы могут быть ассоциированы с моносахаридными компонентами молекулы, так что количественное определение сигналов позволяет определить их моносахаридный состав.

Интегралы каждого из этих сигналов были нормализованы, начиная со значения, установленного для интеграла DMMA, используя ту же процедуру, которая была описана для экспериментов с использованием ^1H ЯМР. Количественное определение характеристики сигналов дельтепарин натрия показано в следующей таблице:

Сигнал	Относительная доля, %
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
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

ПРИМЕР 7

Исследование тинзапарин натрия методом ^1H ЯМР.

Основные идентифицированные сигналы:

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Сигнал	Химический сдвиг, м.д.
H4 Δ U2S	5.992	H6 ANS6S	4.344
H4 Δ U	5.825	H6' ANS6S	4.210
H1 ANS(-G)	5.585	H3 ANS	3.670
H1 Δ U2S	5.509	H2 ANS3S	3.395
H1 ANS6S	5.405	H2 ANS	3.293
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		

Количественное определение характерных и хорошо дифференцированных сигналов тинзапарин натрия (как правило, соответствующих аномерным протонам, H1) показано в следующей таблице с наблюдаемыми значениями относительной долевой пропорции для серии из шести образцов.

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Относительная доля, %
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

ПРИМЕР 8

Такое же решение, используемое в примере 7, используется для проведения исследования с использованием ^1H - ^{13}C HSQC. Основные идентифицированные сигналы:

Сигнал	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.	Сигнал	$\delta^{13}\text{C}$, м.д.	$\delta^1\text{H}$, м.д.
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)// ANS6S red	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 $\Delta\text{U}2\text{S}$	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
C1-H1 G (-ANS3S)	103.91	4.61	C5-H5 I2S	72.01	4.83
C1-H1 ΔU	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
C1-H1 ANAc	100.23	5.31	C5-H5 Xyl	65.86	3.40
C1-H1 $\Delta\text{U}2\text{S}$	100.18	5.51	C3-H3 $\Delta\text{U}2\text{S}$	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
C1-H1 ANS,3S	99.06	5.51	C2-H2 ANS6S(-G)	60.52	3.29
C1-H1 ANS βred	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 αred	95.70	5.42	DMMA	26.73	1.32
C1-H1 I2S βred	94.76	4.97	NAc	24.87	2.05
C1-H1 ANS αred // ANS6S red	93.97	5.45			

Эти сигналы могут быть ассоциированы с моносахаридными компонентами молекулы, так что количественное определение сигналов позволяет определить их моносахаридный состав.

Интегралы каждого из этих сигналов были нормализованы, начиная со значения, установленного для интеграла DMMA, используя ту же процедуру, которая была описана для

экспериментов с использованием ^1H ЯМР. Количественное определение характеристики сигналов тинзапарин натрия показано в следующей таблице:

Сигнал	Относительная доля, %
C1-H1 ANS-I2S	27.2
C1-H1 ANS-I	3.2
C1-H1 ANS-G	3.4
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
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

Эти эксперименты показывают, что используя описанные выше экспериментальные условия, с помощью ядерного магнитного резонанса (^1H ЯМР и ^1H - ^{13}C HSQC) можно создать способ анализа гликозаминогликанов в целом, и гепаринов и низкомолекулярных гепаринов, а также их производных, в частности, что позволяет проводить их количественный анализ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ анализа состава, содержащего моносакхаридные остатки, присутствующие в цепях гепарина, с помощью одномерного ядерного магнитного резонанса ^1H ЯМР и/или двумерного ядерного магнитного резонанса ^1H - ^{13}C HSQC, включающий следующие этапы:

а) получение состава, включающего, по меньшей мере, один моносакхаридный остаток, присутствующий в цепях гепарина, и получение его спектра путем одномерного ядерного магнитного резонанса ^1H ЯМР и/или двумерного ядерного магнитного резонанса ^1H - ^{13}C HSQC с использованием диметилмалоновой кислоты (DMMA) в качестве внутреннего эталона, и затем

б) выявление в спектре ЯМР факта присутствия или отсутствия как минимум одного сигнала как минимум одного остатка, выбранного из группы, состоящей из: 4,5-ненасыщенной 2-О-сульфоуроновой кислоты (ΔU2S), 4,5-ненасыщенной уроновой кислоты (ΔU), 2-N-сульфо-1,6-ангидроглюкозамина (1,6-an.A), 2-N-сульфо-1,6-ангидроманнозамина (1,6-an.M), 2-N-сульфо-6-О-сульфоглюкозамина (ANS6S), 2,5-ангидроманнита, N-сульфоглюкозамина, глюкуроновой кислоты, N-сульфо-6-О-сульфоглюкозамина, 2-О-сульфоидуроновой кислоты, идуроновой кислоты, N-сульфо-3-О-сульфоглюкозамина, N-сульфо-3,6-ди-О-сульфоглюкозамина, галактуроновой кислоты, ксилозы, N-ацетилглюкозамина и N-ацетил-6-О-сульфоглюкозамина,

отличающийся тем, что наличие указанных ЯМР сигналов в определенной относительной пропорции ее нормализованных интегралов по отношению к DMMA или их отсутствие составляет образец, который позволяет идентифицировать гепарин, который представляет собой моносакхаридный остаток, путем сравнения модели, полученной в анализе, с эталоном, ранее полученным для разных гепаринов при тех же условиях.

2. Способ по п.1, где на этапе с) в спектре ^1H ЯМР идентифицируют следующую структуру:

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Относительная доля, %
H4 ΔU2S	5,99	4,3-4,7
H4 ΔU	5,82	0,2
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
H5 I2S	4,84	14,3-16,3
H2 ANS	3,29	24,3-26,6
NAc	2,05	12,0-15,3

тем самым определяя, что моносахаридные остатки происходят из эноксапарин натрия.

3. Способ по п.1, где на этапе с) в спектре ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР идентифицируют следующую структуру:

Сигнал	Относительная доля, %
C1-H1 ANS-I2S	25,6-26,9
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-αred	< LC
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-αred	1,0-1,3
C1-H1 I2S	24,5-27,5
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
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
Ерох	< LC-0,4

где «LC» является «пределом количественной оценки»,
тем самым определяя, что моносахаридные остатки происходят из эноксапарин натрия.

4. Способ по п.1, где на этапе с) в спектре ^1H ЯМР идентифицируют следующую структуру:

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Относительная доля, %
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
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

тем самым определяя, что моносахаридные остатки происходят из бемипарин натрия.

5. Способ по п.1, где на этапе с) в спектре ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР идентифицируют следующую структуру:

Сигнал	Относительная доля, %
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
C1-H1 ANAc	1,7-3,0
C1-H1 ANAc-ared	< 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
C1-H1 MNS-ared	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
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

тем самым определяя, что моносахаридные остатки происходят из бемипарин натрия.

6. Способ по п.1, где на этапе с) в спектре ^1H ЯМР идентифицируют следующую структуру:

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Относительная доля, %
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

тем самым определяя, что моносахаридные остатки происходят из дальтепарин натрия.

7. Способ по п. 1, где на этапе с) в спектре ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР идентифицируют следующую структуру:

Сигнал	Относительная доля, %
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
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

тем самым определяя, что моносахаридные остатки происходят из дальтепарин натрия.

8. Способ по п.1, где на этапе с) в спектре ^1H ЯМР идентифицируют следующую структуру:

тем самым определяя, что моносахаридные остатки происходят из тинзапарин натрия.

Сигнал	Химический сдвиг, м.д.	Относительная доля, %
H4 Δ U2S	5,99	2,7
H1 Δ U2S	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

9. Способ по п.1, где на этапе с) в спектре ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР идентифицируют следующую структуру:

Сигнал	Относительная доля, %
C1-H1 ANS-I2S	27,2
C1-H1 ANS-I	3,2
C1-H1 ANS-G	3,4
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
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

тем самым определяя, что моносахаридные остатки происходят из тинзапарин натрия.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором сигналы, соответствующие N-ацетильным группам, присутствуют в области от 1,8 до 2,1 м.д. в ^1H ЯМР-спектроскопии.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором сигналы, соответствующие сахаридному кольцу указанных остатков, проявляются в области от 2,8 до 6,0 м.д. в ^1H ЯМР-спектроскопии.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором сигналы, соответствующие аномерным протонам H1 и протонам H4 невосстанавливающих концов одного из указанных остатков, находятся в области между 4,6 и 6,0 м.д. в ^1H ЯМР спектроскопии.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором в ^1H ЯМР-спектроскопии сигналы 4,5-ненасыщенной 2-O-сульфоуроновой кислоты (Δ U2S) появляются в области между 5,99 и 5,51 м.д., для H4 и аномерных протонов, соответственно, а сигнал 4,5-ненасыщенной уроновой кислоты (Δ U) появляется в области 5,82 м.д. для протона H4, сигнал 2-N-сульфо-1,6-ангидроглюкозамина (1,6-an.A) появляется в области 5,62 м.д. для аномерного протона,

сигнал 2-N-сульфо-1,6-ангидроманнозамина (1,6-an.M) появляется в области 5,57 м.д. для аномерного протона, а сигналы 2-N-сульфо-6-O-сульфоглюкозамина появляются в области между 5,41 и 4,21-4,34 м.д. для протонов H1 и H6 и H6 ' соответственно.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, где в ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР-спектроскопии сигналы 4,5-ненасыщенной 2-O-сульфоуроновой кислоты (ΔU2S) появляются при 6,0-109,0 м.д. (H4-C4), 5,5-100,2 м.д. (H1-C1), 4,6-77,4 м.д. (H2-C2) или 4,3-66,8 м.д. (H3-C3), сигналы 4,5-ненасыщенной уроновой кислоты (ΔU) появляются при 5,8-110,7 м.д. (H4-C4) или 5,2-103,9 м.д. (H1-C1), сигналы 2-N-сульфо-1,6-ангидроглюкозамина (1,6-an.A) появляются при 5,6-104,2 м.д. (H1-C1), 3,2-58,5 м.д. (H2-C2) или 3,8-67,5 м.д. (H6-C6), сигналы 2-N-сульфо-1,6-ангидроманнозамина (1,6-an.M) появляются при 5,6-103,9 м.д. (H1-C1), 3,5-55,1 (H2-C2) или 3,8-67,5 м.д. (H6-C6), а сигналы 2-N-сульфо-6-O-сульфоглюкозамина появляются при 5,4-99,4 м.д. (H1-C1), 3,8-80,9 м.д. (H4-C4), от 3,7 до 3,8- от 42,3 до 72,5 м.д. (H3-C3), 4,1- от 70,6 до 71,7 м.д. (H5-C5) или от 3,3 до 60,5-60,8 м.д. (H2-C2.).

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором модель, полученная в результате анализа, является таковой, которая определяет, что моносахаридные остатки происходят из нефракционированного гепарина.

16. Способ по любому из п.п.1-8, в котором модель, полученная при анализе, является таковой, которая определяет, что моносахаридные остатки происходят из низкомолекулярного гепарина (LMWH).

17. Способ по любому из п.п.1-8, в котором модель, полученная при анализе, является таковой, которая определяет, что остатки моносахаридов происходят из ультранизкомолекулярного гепарина (ULMWH).

18. Эноксапарин натрия, идентифицируемый с применением любого из способов по п.п.1-17.

19. Бемипарин натрия, идентифицируемый с применением любого из способов по п.п.1-17.

20. Дальтепарин натрия, идентифицируемый с применением

любого из способов по п.п.1-17.

21. Тинзапарин натрия, идентифицируемый с применением
любого из способов по п.п.1-17.

По доверенности

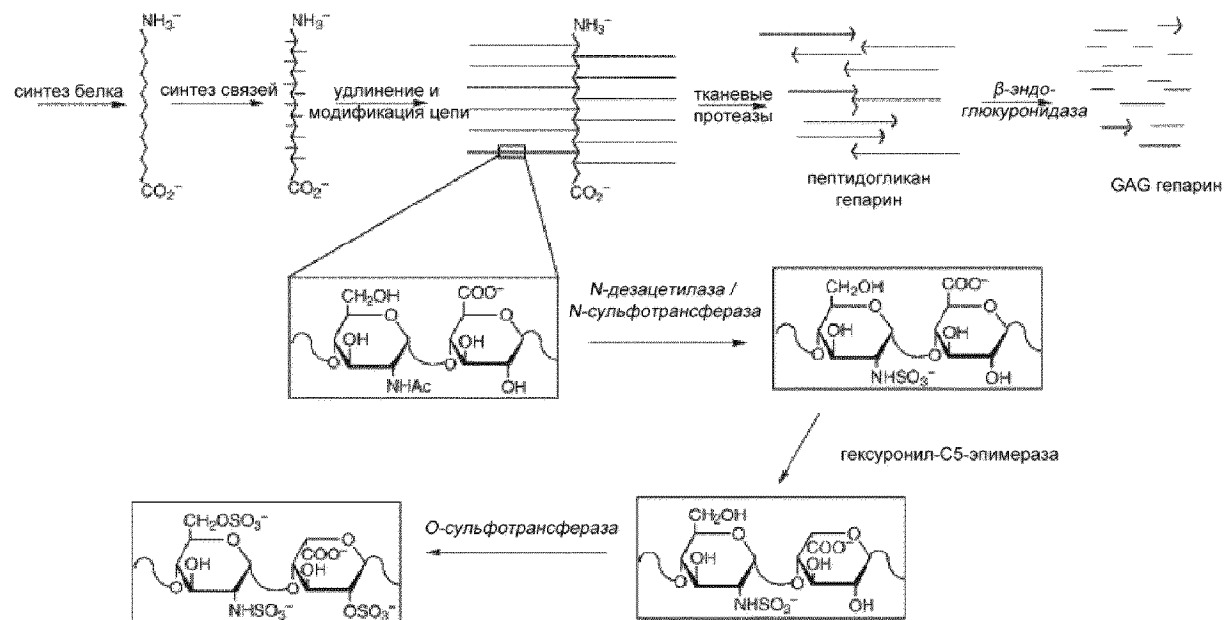


Рис. 1

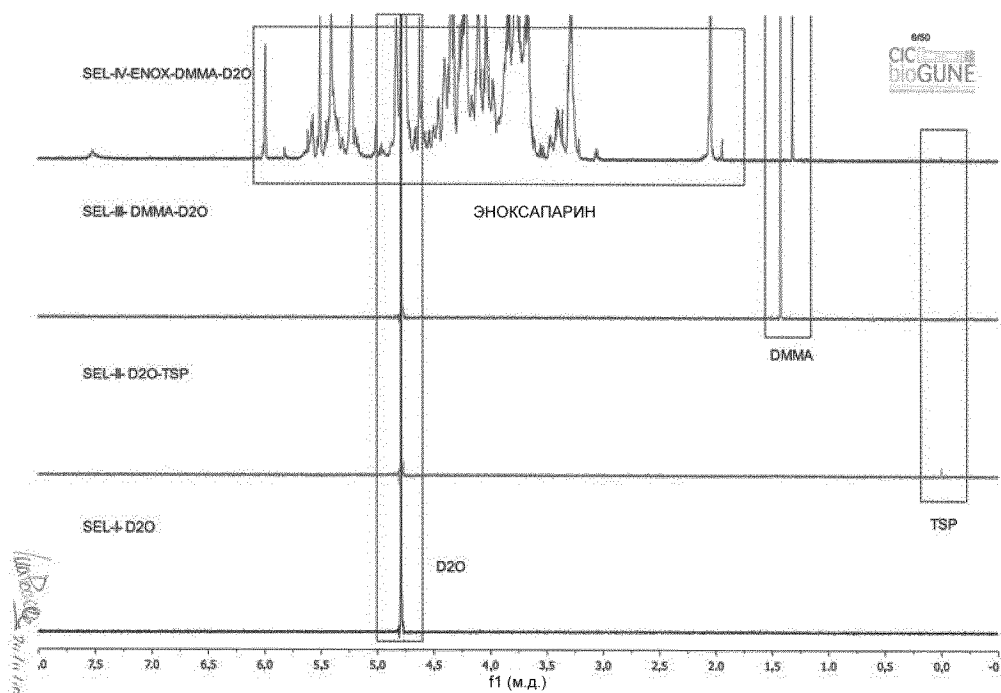


Рис. 2

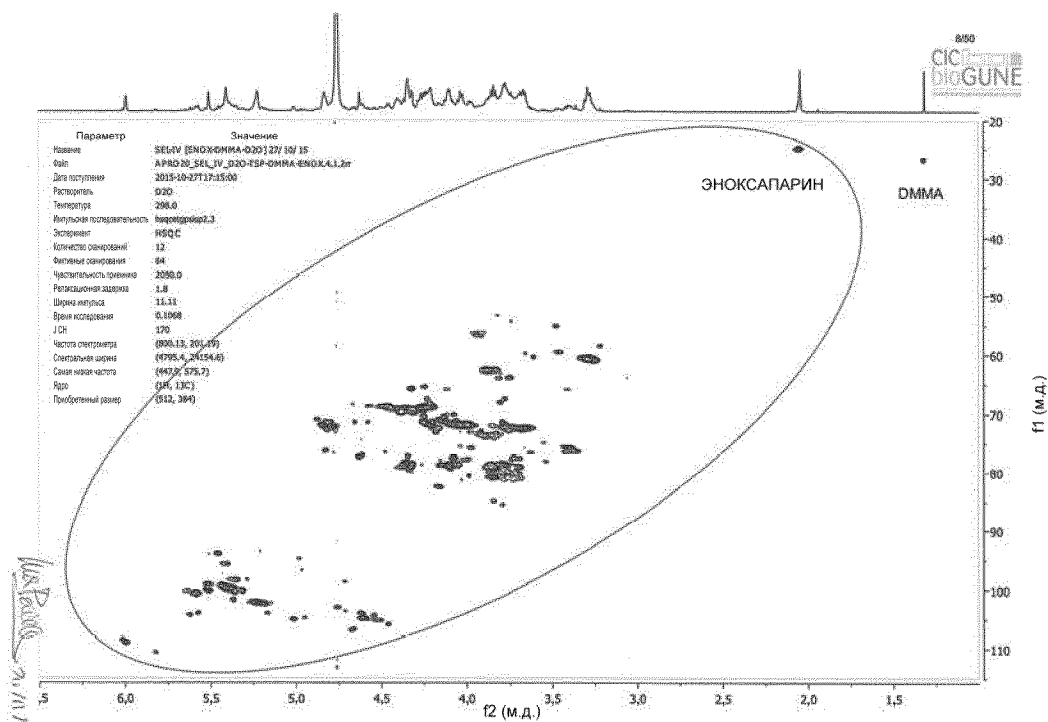
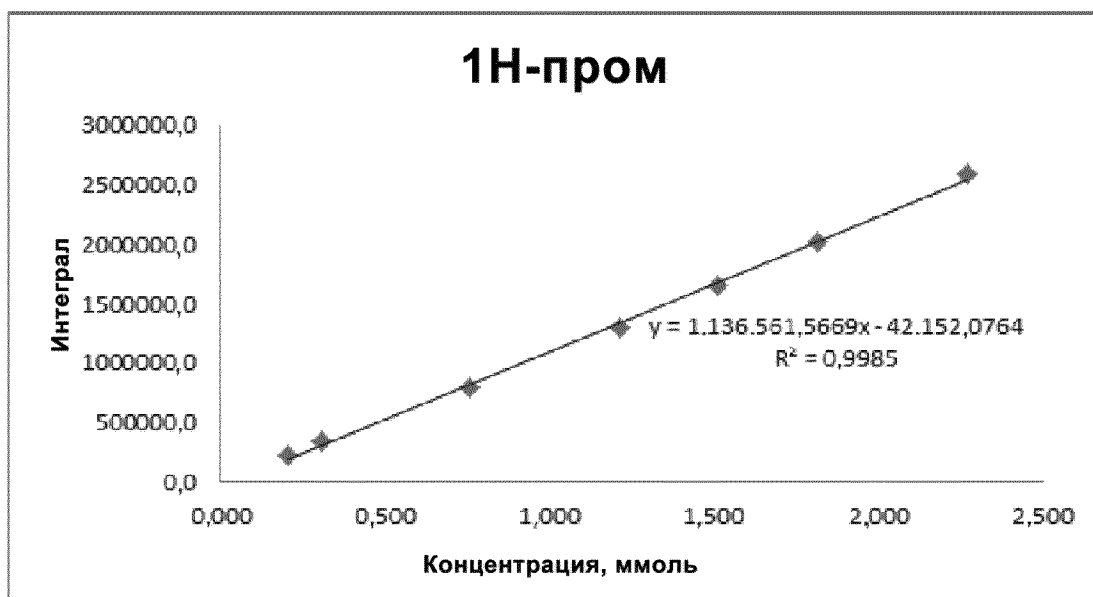
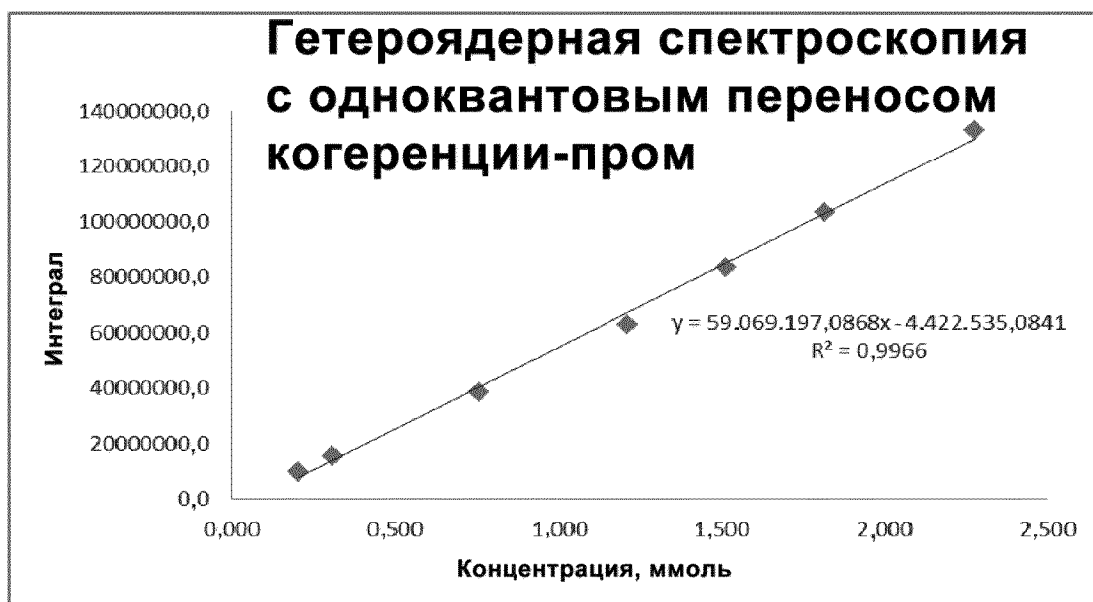


Рис. 3

Рис. 4Рис. 5

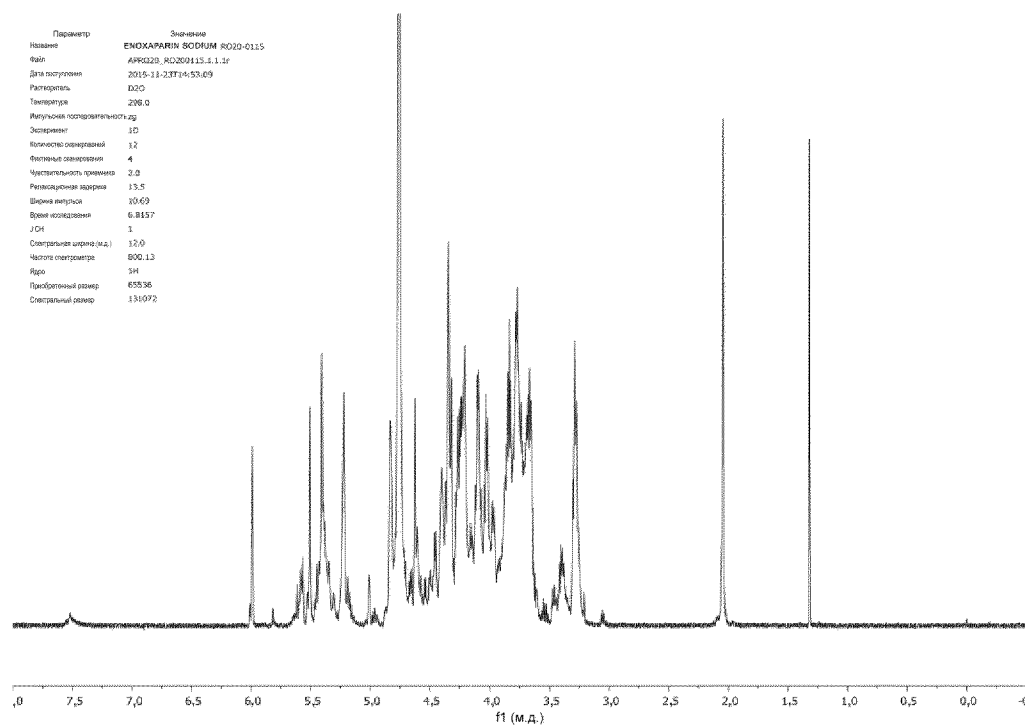


Рис. 6

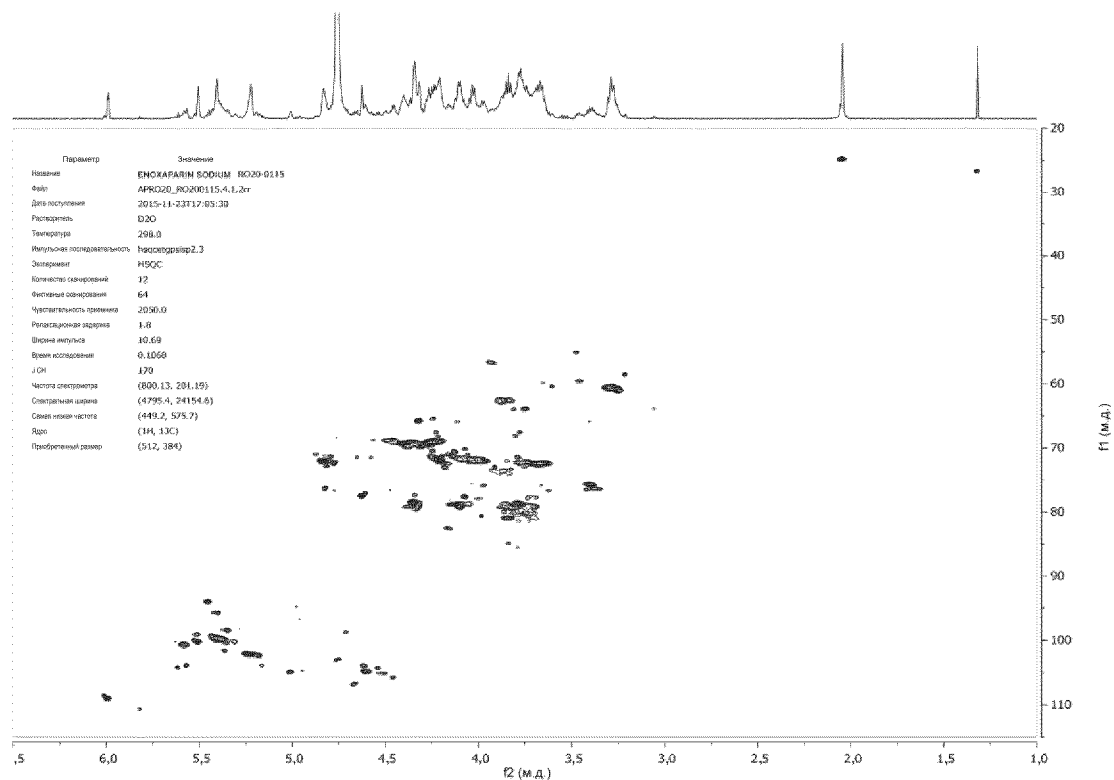


Рис. 7