

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192830 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.04

(51) Int. Cl. C08B 37/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.04.24

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЕПАРИНОВ С ПОМОЩЬЮ
ТАНГЕНЦИАЛЬНОЙ ПОТОЧНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

(31) P201930373; 202010078241.3

(32) 2019.04.26; 2020.01.23

(33) ES; CN

(86) PCT/ES2020/070263

(87) WO 2020/216981 2020.10.29

(71) Заявитель:

ЛАБОРАТОРИОС

ФАРМАСЬЮТИКОС РОВИ С.А. (ES)

(72) Изобретатель:

Франко Родригез Гильермо, Гутьерро
Адуриз Ибон (ES)

(74) Представитель:

Мягкова Е.Н. (RU)

(57) Способ получения низкомолекулярных гепаринов (НМГ) с распределением молекулярной массы от 3,0 до 5,0 кДа, содержащий по меньшей мере один этап концентрации с помощью тангенциальной поточной фильтрации (ТПФ). Способ, в частности, полезен для получения бемипарина или эноксапарина без использования фракционного осаждения и спиртовых растворов. В частности, НМГ получают путем деполимеризации гепарина и фильтрации (ультрафильтрации и/или диафильтрации путем ТПФ) деполимеризованного гепарина без использования фракционного осаждения и спиртового раствора.

A1

202192830

202192830

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЕПАРИНОВ С ПОМОЩЬЮ ТАНГЕНЦИАЛЬНОЙ ПОТОЧНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения низкомолекулярных гепаринов с заданным молекулярно-массовым распределением, содержащему по меньшей мере один этап концентрации с помощью тангенциальной поточной фильтрации. Помимо концентрации путем тангенциальной поточной фильтрации, способ может включать в себя другие этапы, такие как диафильтрация или обработка перекисью водорода. Таким образом, изобретение может быть отнесено к области фармацевтической технологии.

Уровень техники

Гепарин представляет собой полисахарид из семейства гликозаминогликанов, соединение уроновой кислоты (L-идуроновой или D-глюкуроновой кислоты) и D-глюкозамина, связанных попеременно. L-идуроновая кислота может быть 2-O-сульфатированной, а D-глюкозамин может быть N-сульфатированным и/или 6-O-сульфатированным и в меньшей степени N-ацетилированным или 3-O-сульфатированным. Гепарин предпочтительно используют в виде натриевой соли, но также могут использовать в виде соли других щелочных или щелочноземельных металлов и применяют главным образом в качестве антитромботического и антикоагулянтного лекарственного средства.

Гепарины могут быть классифицированы по молекулярной массе на нефракционированный гепарин (НФГ), низкомолекулярный гепарин (НМГ) и очень низкомолекулярный гепарин (ОНМГ). НМГ и ОНМГ получают с помощью деполимеризации исходной молекулы НФГ.

В любом случае для НФГ, а также различных НМГ и ОНМГ, получаемых известными способами деполимеризации (ферментным, азотной кислотой, β -элиминированием и т. д.), текущие процессы очистки осуществляют путем избирательного осаждения их олигосахаридных цепей спиртами (главным образом метанолом и этанолом) и в меньшей степени другими растворителями, такими как ацетон. С учетом использования нескольких объемов спирта на объем водного раствора, содержащего требуемый продукт, а также необходимости, как правило, в

нескольких этапах очистки с промышленной точки зрения эта стратегия очистки представляет проблему относительно объема образующихся отходов спирта в связи с их удалением, хранением и переработкой.

Таким образом, с точки зрения управления отходами большой интерес представляют другие варианты очистки, не требующие использования спирта. Одним из альтернативных вариантов является диализ водного раствора, содержащего требуемый продукт, через мембрану с соответствующим размером пор, но его недостаток заключается в том, что диализ требует большого количества воды, а оптимизированные технологические процессы лабораторного масштаба также сложно масштабировать до промышленного уровня.

Ввиду предшествующего уровня техники существует большое количество способов получения эноксапарина натрия, тем не менее, они намного сложнее способа по настоящему изобретению или основаны на использовании спиртовых растворителей.

Так, в патентном документе CN103342761 раскрыт способ получения эноксапарина натрия, который включает в себя два последовательных этапа ультрафильтрации на мембранах 8 кДа и 2 кДа, соответственно, с целью удаления продуктов разложения и низкомолекулярных примесей и контроля молекулярной массы и молекулярно-массового распределения продукта в присутствии спиртовых растворителей. После получения очищенный продукт лиофилизируют с получением эноксапарина натрия. В данном случае лиофилизацию используют для удаления растворителей и влаги, которые могут сохраняться в структуре эноксапарина натрия, полученного способом по этому патенту.

В патентном документе CN102050888 также раскрыт способ окончательной очистки эноксапарина натрия в присутствии спиртовых растворителей с этапом концентрации на мембране 1 кДа и последующей лиофилизацией, при котором обеспечивается дополнительный контроль молекулярной массы и молекулярно-массового распределения продукта. Как и в предыдущем патенте, лиофилизацию используют для удаления растворителей и влаги, которые могут сохраняться в структуре эноксапарина натрия, полученного способом по этому патенту.

Другие способы получения и/или очистки полисахаридов раскрыты в предшествующем уровне техники: ES2161615A1 – Laboratorios Farmacéuticos ROVI, S.A., US2009105194A1 – Flengsrud, US5767269 – Hirsh, WO2010/111710A1 – Solazyme,

Inc., US2007/0154492A1 – Michon, Griffin et al. (“Isolation and characterization of heparan sulfate from crude porcine intestinal mucosal peptidoglycan heparin” Carbohydr. Res. (1995), 276, 183-197) и US5110918 – Casu. Эти способы требуют фракционного осаждения деполимеризованного гепарина.

С учетом ближайшего предшествующего уровня техники следует отметить, что для всех предыдущих документов характерен недостаток использования спиртов на том или ином этапе технологического процесса, которое на текущий момент является нежелательным ввиду высокого негативного воздействия на окружающую среду. В некоторых документах на одном из этапов тангенциальной поточной фильтрации используют солевые буферные среды. Тем не менее, контроль молекулярной массы с использованием размера пор и параметров, указанных в документах предшествующего уровня техники, не является специфическим и не позволяет определить конкретный структурный профиль получаемого эноксапарина натрия. Соответственно, является желательным получение упрощенной и эффективной процедуры получения НМГ, исключающей использование спиртов, которая при этом обеспечивала бы возможность контроля профиля получаемого продукта таким образом, чтобы ее можно было использовать непрерывно.

Сущность изобретения

В качестве альтернативного варианта в настоящем изобретении используется тангенциальная поточная фильтрация (ТПФ) с применением неспиртовых диафильтрационных буферов, которая представляет собой значительное преимущество по сравнению со способами, описанными в предшествующем уровне техники, поскольку она минимизирует содержание остаточных растворителей в получаемом продукте и, соответственно, профиль чистоты в их отношении. Кроме того, в настоящем изобретении предлагается способ, который можно использовать непрерывно, поскольку он обеспечивает возможность получения заданного профиля получаемого продукта без необходимости в структурных преобразованиях. Это означает, что по сравнению со способами производства, включающими в себя очистку с помощью фракционного осаждения, обеспечивается минимизация времени производства с соответствующим сокращением затрат и повышением производительности.

В некоторых вариантах осуществления способа по изобретению сырой деполимеризованный гепарин представляет собой продукт процесса деполимеризации

гепарина. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению не включает в себя использование фракционного осаждения деполимеризованного гепарина, в частности, не включает в себя использование фракционного осаждения деполимеризованного гепарина, полученного деполимеризацией гепарина. Кроме того, в изобретении предусмотрены варианты осуществления, в которых низкомолекулярный гепарин получают в два основных этапа: а) деполимеризация гепарина с получением сырого деполимеризованного гепарина; б) очистка сырого деполимеризованного гепарина с помощью ТПФ (концентрации и/или диафильтрации с использованием мембран, как описано ниже) без использования фракционного осаждения.

В некоторых вариантах осуществления деполимеризованный гепарин представляет собой эноксапарин натрия или бемипарин натрия, предпочтительно эноксапарин натрия.

В некоторых вариантах осуществления способа по изобретению сырой эноксапарин натрия (или бемипарин натрия) представляет собой продукт процесса деполимеризации гепарина. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению не включает в себя использование фракционного осаждения эноксапарина натрия (или бемипарина натрия), в частности, не включает в себя использование фракционного осаждения эноксапарина натрия (или бемипарина натрия), полученного деполимеризацией гепарина. Кроме того, в изобретении предусмотрены варианты осуществления, в которых эноксапарин натрия (или бемипарин натрия) получают в два основных этапа: а) деполимеризация гепарина с получением сырого эноксапарина натрия (или бемипарина натрия); б) очистка сырого эноксапарина натрия (или бемипарина натрия) с помощью ТПФ (концентрации и/или диафильтрации с использованием мембран, как описано ниже) без использования фракционного осаждения.

В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса (ММ) эноксапарина находится в следующих пределах:

Образец	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-8000 Да, %	М3 >8000 Да, %
Сырой эноксапарин натрия	3000-5000	≤25	60-80	≤20
Полученный эноксапарин натрия (новый способ)	3800-5000	12,0-20,0	68,0-82,0	≤18,0

В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса (ММ) бемипарина находится в следующих пределах:

Образец	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-6000 Да, %	М3 >6000 Да, %
Сырой бемипарин натрия	2500-5000	<40	50-75	<25
Полученный бемипарин натрия (новый способ)	3000-4200	<35,0	50,0-75,0	<15,0

Для контроля параметров, обеспечивающих возможность использования способа по настоящему изобретению, выбирают определенные фильтрационные мембраны с заданным размером пор, который обеспечивает возможность их использования для продуктов в широком диапазоне молекулярных масс. Номинальный предел отсекаемых доступных мембран, как правило, составляет от 1 кДа до 1000 кДа (или ≤ 1 кДа). Номинальный предел отсекаемых по молекулярной массе (NMWCO) определяется как минимальная молекулярная масса растворенного компонента, который на 90 % задерживается мембраной и определяется путем оценки задерживания мембраной компонентов с различной молекулярной массой (Фиг. 6).

Для НМГ, такого как бемипарин натрия или эноксапарин натрия, со средней молекулярной массой 3600 и 4400 Да, соответственно, диапазон доступных мембран

ограничивается мембранами с номинальным пределом отсечения приблизительно ≤ 1 кДа, поскольку увеличение размера пор приведет к потере олигосахаридных цепей с наименьшей молекулярной массой.

Авторы настоящего изобретения разработали способ, обеспечивающий возможность получения НМГ и, в частности, эноксапарина натрия и бемипарина натрия, путем концентрации с помощью ТПФ без необходимости использования спиртов или других органических растворителей, а также солевых буферных сред с получением продукта повышенной чистоты по сравнению с описанными в документах предшествующего уровня техники и с соответствующими показателями качества согласно параметрам, установленным в статье на данный продукт Европейской фармакопеи (действующего издания) и Фармакопеи США (действующего издания). Кроме того, продукт имеет средний профиль молекулярной массы и распределение олигосахаридных цепей, подходящие для возможного фармакологического применения.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения низкомолекулярных гепаринов (НМГ) со средним распределением молекулярной массы от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0 кДа, содержащему следующие этапы:

- а) получение раствора деполимеризованного гепарина с диапазоном распределения олигосахаридных цепей от приблизительно 0,6 до приблизительно 10 кДа и концентрацией гепарина до приблизительно 4 % в/о;
- б) выполнение этапа концентрации путем тангенциальной поточной фильтрации (ТПФ) в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения приблизительно 1 кДа для достижения концентрации гепарина до приблизительно 25 % в/о.

Предпочтительно раствор этапа а представляет собой водный раствор.

Концентрация гепарина на этапе а предпочтительно составляет от приблизительно 3 % до приблизительно 4 % в/о, более предпочтительно от приблизительно 3,5 % до приблизительно 4 % в/о и еще более предпочтительно приблизительно 4 % в/о.

Предпочтительно мембрана, используемая для концентрации путем тангенциальной поточной фильтрации, имеет номинальный предел отсечения от приблизительно 0,7 до приблизительно 1 кДа и более предпочтительно от

приблизительно 0,9 до приблизительно 1 кДа. В конкретном варианте осуществления она имеет номинальный предел отсечения приблизительно 1 кДа.

Тангенциальная поточная фильтрация, а также остальные этапы способа по изобретению (осветление, глубинная фильтрация, диафильтрация, обработка H_2O_2) могут быть выполнены в водной фазе без спирта или любых других органических растворителей.

Этап b может включать в себя выполнение по меньшей мере одного этапа концентрации путем тангенциальной поточной фильтрации в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения приблизительно ≤ 1 кДа, т. е. 1, 2 или 3 этапа, до достижения максимальной концентрации гепарина до приблизительно 25 % в/о.

На этапе b получаемая концентрация гепарина может составлять по меньшей мере 5 % в/о, предпочтительно по меньшей мере 8 % в/о. Предпочтительно на этапе b достигается концентрация гепарина по меньшей мере 10 % в/о, предпочтительно от приблизительно 10 % до приблизительно 25 в/о, более предпочтительно от приблизительно 10 % до приблизительно 22 % в/о, еще более предпочтительно от приблизительно 10 % до приблизительно 20 %. В конкретном варианте осуществления на этапе b достигается концентрация гепарина от приблизительно 10 % до приблизительно 22 % в/о.

В одном варианте осуществления на этапе b выполняется один этап концентрации путем ТПФ. В конкретном варианте осуществления на этапе b выполняется один этап концентрации путем ТПФ с получением концентрации гепарина по меньшей мере 10 % в/о, предпочтительно от приблизительно 10 % до приблизительно 22 % в/о, более предпочтительно от приблизительно 12 % до приблизительно 22 % в/о.

В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения на этапе b выполняется один этап концентрации путем ТПФ с получением концентрации гепарина по меньшей мере 5 % в/о, предпочтительно по меньшей мере 10 % в/о, более предпочтительно от приблизительно 5 % до приблизительно 15 % в/о или от приблизительно 10 % до приблизительно 22 % в/о.

В еще одном варианте осуществления способ по изобретению содержит:

а) получение раствора деполимеризованного гепарина с диапазоном распределения

олигосахаридных цепей от 0,6 до 10 кДа и концентрацией гепарина от приблизительно 3 % до приблизительно 4 % в/о, предпочтительно 4 % в/о;

б) выполнение одного этапа концентрации путем тангенциальной поточной фильтрации (ТПФ) в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения ≤ 1 кДа для достижения концентрации гепарина до 25 % в/о, предпочтительно от приблизительно 12 % до приблизительно 22 % в/о.

В еще одном варианте осуществления этап b содержит два этапа концентрации путем ТПФ.

В предпочтительном варианте осуществления на этапе b первый этап концентрации выполняется путем ТПФ для достижения концентрации гепарина от приблизительно 4 % до приблизительно 10 % в/о, предпочтительно от приблизительно 5 % до приблизительно 10 % в/о, а второй этап концентрации путем ТПФ – для достижения концентрации гепарина от приблизительно 10 % до приблизительно 25 % в/о. В более предпочтительном варианте осуществления на втором этапе концентрации достигается концентрация гепарина от приблизительно 12 % до приблизительно 25 % в/о и более предпочтительно от приблизительно 12 % до приблизительно 22 % в/о.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления выполняется один этап концентрации путем ТПФ для повышения концентрации от приблизительно 4 % в/о до приблизительно 12-22 % в/о (или приблизительно 10-25 % в/о).

Способ по изобретению может включать в себя один или несколько дополнительных этапов, таких как осветление, глубинная фильтрация, диафильтрация водой, обработка перекисью водорода или лиофилизация.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления выполняется по меньшей мере один этап осветления раствора гепарина, полученного на этапе а.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления выполняется по меньшей мере один этап глубинной фильтрации, который может быть выполнен до или после любого из этапов концентрации путем ТПФ. Например, до или после этапа концентрации путем ТПФ (если выполняется всего один такой этап) или до или после первого этапа концентрации путем ТПФ, если этап b содержит больше одного такого этапа.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления выполняется по меньшей мере один этап диафильтрации водой, который может быть выполнен до или

после любого из этапов концентрации путем ТПФ. Например, до или после этапа концентрации путем ТПФ или до или после первого этапа концентрации путем ТПФ, если этап b содержит больше одного такого этапа.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления выполняется этап обработки H_2O_2 , который может быть выполнен до или после любого этапа концентрации путем ТПФ, если этап b содержит больше одного этапа концентрации путем ТПФ. Например, если этап b содержит два этапа концентрации путем ТПФ, этап обработки H_2O_2 может быть выполнен до первого этапа концентрации или до второго этапа концентрации.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления выполняется по меньшей мере один этап диафильтрации водой, который может быть выполнен до этапа концентрации путем ТПФ или первого этапа концентрации путем ТПФ (если этап b содержит больше одного этапа концентрации путем ТПФ) или до вышеуказанного этапа обработки H_2O_2 .

В еще одном варианте осуществления выполняется этап лиофилизации концентрата, полученного на этапе b.

В настоящем изобретении под НМГ понимаются гепарины со средней молекулярной массой менее приблизительно 8000 Да. С учетом того, что одной из целей способа по изобретению является удаление примесей, связанных с процессом производства, которые, как правило, имеют низкую молекулярную массу (< 500 Да), диапазон доступных для применения мембран ограничен, поскольку в идеале они должны иметь предел отсеечения ниже средней молекулярной массы НМГ для обеспечения возможности удаления низкомолекулярных примесей без потерь олигосахаридных цепей. Предпочтительно номинальный предел отсеечения используемых мембран составляет ≤ 1 кДа, тем не менее, его значение может изменяться в зависимости от получаемой молекулярной массы.

Специалистам в данной области техники должно быть известно, что между различными этапами концентрации путем ТПФ предпочтительно выполняются этапы обслуживания, которые могут быть необходимы для очистки и/или регенерации мембран, с использованием воды, NaOH или любого другого продукта в соответствии с их описанием.

В описании приведен один или несколько вариантов осуществления, включающих признаки настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения не

ограничивается только описанными в нем вариантами осуществления. Изобретение включает в себя все комбинации и подкомбинации различных аспектов и вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Эти и другие аспекты изобретения будут понятны со ссылкой на следующее подробное описание, формулу изобретения и прилагаемые чертежи.

Краткое описание чертежей

На чертежах, прилагаемых к настоящему документу и составляющих часть описания, проиллюстрированы один или несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, и вместе с описанием они раскрывают принципы настоящего изобретения и предоставляют специалисту в данной области техники возможность воспроизведения и использования изобретения. Следующие чертежи приведены только для наглядности и никоим образом не ограничивают полный объем настоящего изобретения.

Фиг. 1 - сравнительная схема нормальной поточной фильтрации и тангенциальной поточной фильтрации;

фиг. 2 - общая схема способа тангенциальной фильтрации;

фиг. 3 - сравнение способов концентрации и диафильтрации;

фиг. 4А и 4В - схемы способа очистки согласно изобретению;

фиг. 5А-5D - различные графики, отображающие линейный характер изменчивости средней молекулярной массы (фиг. 5А) и распределения молекулярной массы (ФИГ. 5В: <2000 кДа; ФИГ. 5С: >8000 кДа; ФИГ. 5D: 2000-8000 кДа) на втором этапе концентрации в диапазоне от 10 % до 20 % номинальной концентрации продукта в концентрате;

фиг. 6 - определение номинального предела отсечения.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

В настоящем изобретении под «тангенциальной поточной фильтрацией», или «ТПФ», понимается способ фильтрации, при которой фильтруемый раствор тангенциально проходит через поверхность фильтра таким образом, что создаваемый перепад давления обеспечивает прохождение через нее компонентов, размер которых меньше размера пор (фильтрат). Компоненты большего размера задерживаются на поверхности фильтра и возвращаются в расходный резервуар (концентрат).

В настоящем изобретении под «осветлением» понимается фильтрация, выполняемая для удаления суспендированных частиц, присутствующих в растворе, такая как фильтрация, выполняемая с использованием фильтров с размером пор 1-60 мкм, предпочтительно 1-25 мкм.

В настоящем изобретении под «глубинной фильтрацией» понимается фильтрация, при которой используется многоступенчатый лабиринтный фильтрующий материал, который помогает задерживать частицы. Частицы большего размера задерживаются на поверхности, а более мелкие поступают внутрь фильтрующего материала и задерживаются во внутренних слоях, что обеспечивает снижение мутности раствора. В конкретном варианте осуществления для фильтрации используют фильтры с размером пор 1-5 мкм, предпочтительно 2-4 мкм. Фильтрация может выполняться с использованием воды или буферного раствора.

В настоящем изобретении под «концентрацией» понимается этап тангенциальной фильтрации, на котором повышается концентрация концентрируемого продукта в растворе путем удаления фильтрата (см. Фиг. 3).

В настоящем изобретении под «диафильтрацией» понимается этап тангенциальной фильтрации, на котором при удалении фильтрата в раствор с тем же расходом подается вода или буферный раствор для поддержания неизменной концентрации концентрата в растворе (см. Фиг. 3). В данном случае можно использовать мембрану, такую как используемая на этапе концентрации путем ТПФ, то есть, мембрану с номинальный пределом отсечения приблизительно ≤ 1 кДа, предпочтительно от приблизительно 0,7 до приблизительно 1 кДа, более предпочтительно от приблизительно 0,9 до приблизительно 1 кДа и еще более предпочтительно приблизительно 1 кДа.

В одном варианте осуществления гепарин (после деполимеризации) представляет собой натриевую соль гепарина, например, эноксапарин натрия или бемипарин натрия.

Сырой эноксапарин натрия может быть получен путем щелочной деполимеризации (например, с использованием NaOH) сложного бензилового эфира гепарина, полученного из слизистой оболочки кишечника свиней.

В одном конкретном варианте осуществления продукт, получаемый после деполимеризации эноксапарина натрия, соответствует раствору, который, помимо сырого эноксапарина натрия, также содержит примеси, соответствующие омылению в

щелочной среде сложного бензилового эфира гепарина, и соли, соответствующие приведению уровня pH в процессе осветления. В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения способ ТПФ применяется для обработки этого раствора сырого эноксапарина натрия, так что концентрация этого раствора выполняется с целью, с одной стороны, удаления низкомолекулярных примесей, а с другой – для достижения соответствующей концентрации для выполнения осветления перекисью водорода. В качестве альтернативы обработка H_2O_2 может быть выполнена до этапа концентрации путем ТПФ. Эти этапы могут быть выполнены без использования фракционного осаждения сырого продукта (сырого деполимеризованного гепарина).

В качестве альтернативы обработка H_2O_2 может быть выполнена до этапа концентрации путем ТПФ.

Кроме того, для тщательного удаления низкомолекулярных примесей может быть использован способ диафильтрации (необязательный) до или после этапа концентрации. В конце этого этапа в некоторых случаях выполняется второй этап концентрации для удаления образующихся солевых примесей и корректировки содержания низкомолекулярных олигосахаридных цепей, для чего осуществляется контроль средней молекулярной массы раствора; по достижении оптимального значения выполняется лиофилизация для получения эноксапарина натрия соответствующей чистоты.

Таким образом, в одном конкретном варианте осуществления способ по изобретению содержит:

а) получение раствора деполимеризованного гепарина с диапазоном распределения олигосахаридных цепей от 0,6 до 10 кДа и концентрацией эноксапарина натрия приблизительно 4 % в/о;

б) выполнение этапа концентрации путем ТПФ в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения ≤ 1 кДа до достижения концентрации гепарина до приблизительно 25 % в/о, до приблизительно 10 % в/о или предпочтительно от приблизительно 5 % до приблизительно 10 % в/о;

с) в некоторых случаях выполнение этапа диафильтрации водой (например, незабуференной водой) до или после этапа б;

д) выполнение этапа обработки H_2O_2 до или после этапа б;

е) в некоторых случаях выполнение одного этапа концентрации путем ТПФ в

водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения ≤ 1 кДа для достижения концентрации гепарина до 25 % в/о, предпочтительно от приблизительно 12 % до приблизительно 25 % в/о;

f) выполнение этапа лиофилизации полученного продукта.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению содержит:

a) получение раствора деполимеризованного эноксапарина натрия с диапазоном распределения олигосахаридных цепей от приблизительно 0,6 до приблизительно 10 кДа и концентрацией эноксапарина натрия до 4 % в/о;

b) выполнение этапа концентрации путем ТПФ в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения ≤ 1 кДа до достижения концентрации гепарина до приблизительно 25 % в/о, до приблизительно 10 % в/о или предпочтительно от приблизительно 5 % до приблизительно 10 % в/о;

c) выполнение этапа обработки H_2O_2 продукта, полученного на этапе b;

d) выполнение одного этапа концентрации путем ТПФ в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения ≤ 1 кДа для достижения концентрации гепарина до 25 % в/о, предпочтительно от приблизительно 12 % до приблизительно 25 % в/о;

e) выполнение этапа лиофилизации полученного продукта.

Предпочтительно способ по настоящему изобретению включает в себя этап осветления и/или глубинной фильтрации до этапа b.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению содержит:

a) получение раствора деполимеризованного эноксапарина натрия с диапазоном распределения олигосахаридных цепей от приблизительно 0,6 до приблизительно 10 кДа и концентрацией эноксапарина натрия до 4 % в/о;

b) выполнение этапа концентрации путем ТПФ в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения ≤ 1 кДа до достижения концентрации гепарина до приблизительно 25 % в/о, до приблизительно 10 % в/о или предпочтительно от приблизительно 5 % до приблизительно 10 % в/о;

c) выполнение этапа диафильтрации водой продукта, полученного на этапе b;

d) выполнение этапа обработки H_2O_2 продукта, полученного на этапе c;

е) в некоторых случаях выполнение этапа глубинной фильтрации продукта, полученного на этапе d;

ф) выполнение одного этапа концентрации путем ТПФ в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсека ≤ 1 кДа для достижения концентрации гепарина до 25 % в/о, предпочтительно от приблизительно 12 % до приблизительно 25 % в/о;

g) выполнение этапа лиофилизации полученного продукта.

Предпочтительно способ по настоящему изобретению включает в себя этап осветления и/или глубинной фильтрации до этапа b.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению содержит:

а) получение раствора деполимеризованного эноксапарина натрия с диапазоном распределения олигосахаридных цепей от 0,6 до 10 кДа и концентрацией эноксапарина натрия до 4 % в/о;

б) выполнение одного этапа концентрации путем ТПФ в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсека ≤ 1 кДа для достижения концентрации гепарина до 25 % в/о, предпочтительно от приблизительно 5 % до приблизительно 10 % в/о;

с) выполнение этапа глубинной фильтрации продукта, полученного на этапе b;

д) выполнение этапа обработки H_2O_2 продукта, полученного на этапе с;

е) выполнение одного этапа концентрации путем ТПФ в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсека ≤ 1 кДа для достижения концентрации гепарина до 25 % в/о, предпочтительно от приблизительно 12 % до приблизительно 25 % в/о;

ф) выполнение этапа лиофилизации полученного продукта.

Предпочтительно способ по настоящему изобретению включает в себя этап осветления и/или глубинной фильтрации до этапа b.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению содержит:

а) получение раствора деполимеризованного эноксапарина натрия с диапазоном распределения олигосахаридных цепей от 0,6 до 10 кДа и концентрацией эноксапарина натрия до 4 % в/о;

- b) выполнение этапа диафильтрации водой раствора, полученного на этапе а;
- с) выполнение этапа обработки H_2O_2 продукта, полученного на этапе с;
- d) выполнение одного этапа концентрации путем ТПФ в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения ≤ 1 кДа для достижения концентрации гепарина приблизительно 25 % в/о, предпочтительно от приблизительно 5 % до приблизительно 20 % в/о;
- e) выполнение этапа лиофилизации полученного продукта.

Предпочтительно способ по настоящему изобретению включает в себя этап осветления и/или глубинной фильтрации до этапа b.

Примеры

Нижеприведенные конкретные примеры служат для иллюстрации характера настоящего изобретения. Эти примеры приведены только для наглядности и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Сырой эноксапарин натрия и бемипарин натрия приготавливали путем деполимеризации гепарина без выполнения фракционного осаждения.

Ниже приведено описание способа получения сырого эноксапарина натрия – исходного продукта, используемого в описанных примерах 1, 2, 3, 4 и 5. 10 г гепарина натрия растворяют в очищенной воде и при перемешивании добавляют раствор бензетония хлорида с получением бензетония гепарината. Продукт несколько раз промывают водой для удаления избытка хлоридов и в конце высушивают продукт путем лиофилизации. Бензетония гепаринат растворяют в метиленхлориде и регулируют температуру. Добавляют бензилхлорид и дают вступить в реакцию. Полученный продукт представляет собой сложный бензиловый эфир гепарина. Сложный бензиловый эфир гепарина растворяют в воде и добавляют гидроксид натрия. По завершении реакции нейтрализуют раствор: полученный продукт представляет собой сырой эноксапарин натрия. После получения сырого эноксапарина натрия выполняли описанные ниже примеры.

Пример 1

Выполняли способ по изобретению со следующими основными этапами:

- a) первая концентрация путем ТПФ для получения продукта с концентрацией гепарина от 4 % до 10 % в/о;

б) диафильтрация и обработка H_2O_2 ;

с) вторая концентрация путем ТПФ для получения готового продукта с концентрацией гепарина от 10 % до 20 % в/о.

Первоначально в качестве исходного продукта использовали сырой эноксапарин натрия с концентрацией продукта 40 г/л и распределением олигосахаридных цепей от 0,6 до 10 кДа. Этот исходный продукт подвергали предварительной фильтрации через фильтр Clarigard® с размером пор 3,0 мкм. Продуктом процесса деполимеризации гепарина является сырой эноксапарин натрия.

Затем выполняли первый этап концентрации путем ТПФ, предназначенный для повышения концентрации эноксапарина до значения от 4 % до 10 %, а также снижения концентрации примесей (главным образом солей с молекулярной массой < 0.5 кДа и других низкомолекулярных продуктов, связанных с предыдущими процессами производства). Для этого использовали мембрану Millipore® из регенерированной целлюлозы с номинальный пределом отсечения ≤ 1 кДа. Этап концентрации начинали при около 2005 г продукта и трансмембранном давлении (ТМД) 3,25 бар перед пропусканием потока фильтрата в отдельную емкость, систему выдерживали в режиме полной рециркуляции около 15 минут.

На этапе концентрации расход фильтрата составлял от 9 л/м²/ч в начале до 4,8 л/м²/ч в конце этапа (53 % начального расхода) при среднем расходе 6,2 л/м²/ч. Отбирали 2 образца фильтрата: один при VCF (коэффициент объемной концентрации) = 1,26 (P1), другой – из объема фильтрата в конце этапа концентрации (P2). Также отбирали образец из объема материала, задержанного в конце этапа концентрации (R1), и образец исходного сырья после предварительной фильтрации через фильтр с размером пор 3,0 мкм (B1). Основные данные анализа концентрации приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Анализ концентрации НМГ (4 → 10 %)							
Начальный объем (л)	Извлекаемый объем (л)	VCF (крат.)	Средний расход фильтрата (л/м ² /ч)	T (°C)	Время (мин)	Перепад давления (бар)	Тангенциальный расход (л/м ² /мин)
2,005	1,2	2,49	6,2	23,6 → 25,7	106	0,5 → 0,7	5,3

Далее выполняли этап диафильтрации с использованием очищенной воды, предназначенный для осветления полученного продукта. На этапе диафильтрации расход фильтрата непрерывно снижали от 8,4 л/м²/ч в начале до 2,4 л/м²/ч в конце этапа (приблизительно 29 %) при среднем расходе 5,03 л/м²/ч. Отбирали 3 образца фильтрата в конце каждого диаобъема (D1, D2 и D3, соответственно и один образец из объема материала, задержанного в конце диафильтрации (D5). Условия выполнения анализа диафильтрации приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Анализ диафильтрации НМГ							
Начальный объем (л)	Извлекаемый объем (л)	Объемы диафильтрации (N)	Средний расход фильтрата (л/м ² /ч)	T (°C)	Время (мин)	Перепад давления (бар)	Тангенциальный расход (л/м ² /мин)
0,798	2,3	3	5,03	26,5 → 27,8	390	0,3 → 0,8	5,3

Приблизительно 0,8 л продукта, полученного после диафильтрации, далее вводили в химическую реакцию с H₂O₂.

Перед переходом ко второму этапу концентрации путем ТПФ выполняли дополнительный (необязательный) этап осветления снова с использованием фильтра Clarigard® с размером пор 3,0 мкм для удаления любых частиц, которые могли осесть на дне емкости.

Затем выполняли второй этап концентрации путем ТПФ, на этот раз предназначенный для достижения концентрации эноксапарина от 10 % до 20 % в/о также с использованием мембраны Millipore® из регенерированной целлюлозы с

номинальный пределом отсечения ≤ 1 кДа.

На этапе концентрации расход фильтрата составлял от 3 л/м²/ч в начале до 0,75 л/м²/ч в конце этапа (25 %) при среднем расходе 1,5 л/м²/ч. Отбирали 2 образца фильтрата: один при VCF = 1,34 (P3), другой – из объема фильтрата в конце этапа концентрации (P4). Также отбирали образец концентрата после концентрации (R2), после деполяризации мембраны путем поддержания работы системы при низком ТМД (1,2 бар) в течение 10 минут.

В Таблице 3 ниже приведены значения молекулярной массы образцов, отобранных при выполнении вышеописанного способа, которые были проанализированы в соответствии со способом, установленным в Европейской фармакопее (Евр. фарм.).

Таблица 3. Молекулярная масса образцов, полученных на различных этапах способа				
Образец	ММ, Да	<2000 Да, %	2000-8000 Да, %	>8000 Да, %
Сырой эноксапарин натрия	3737	23,8	71,1	8,1
B1 (осветление на фильтре Clarigard®)	3723	24,0	71,1	5,0
P1 (1-й образец фильтрата, 1-я концентрация)	< 600	---	---	---
P2 (2-й образец фильтрата, 1-я концентрация)	< 600	---	---	---
R1 (концентрат после первого этапа концентрации)	3645	25,2	69,9	4,8
D1 (фильтрат после первого диаобъема)	1196	96,5	3,5	0,0
D2 (фильтрат после второго диаобъема)	1491	84,5	15,5	0,0
D3 (фильтрат после третьего диаобъема)	1646	78,1	21,9	7,0
D5 (концентрат после завершения диафильтрации)	4158	14,6	78,4	7,0

Таблица 3. Молекулярная масса образцов, полученных на различных этапах способа				
Образец	ММ, Да	<2000 Да, %	2000-8000 Да, %	>8000 Да, %
P3 (1-й образец фильтрата, 2-я концентрация)	1866	67,3	32,7	0,0
P4 (2-й образец фильтрата, 2-я концентрация)	1991	60,3	39,7	0,0
R2 (концентрат после второго этапа концентрации)	4444	8,1	84,0	7,9

Как показывают процентные доли фракций с различной молекулярной массой целевого продукта (менее 2000 Да, от 2000 до 8000 Да и более 8000 Да) в таблице выше, представляется, что первый этап концентрации не оказывает отрицательного влияния на профиль продукта (отсутствуют потери любых фракций в фильтрате, как видно по данным образцов P1 и P2).

Данные образцов, отобранных в процессе диафильтрации, D1, D2, D3 и D5 показывают, что:

- потери фракции с наибольшей ММ в фильтрате на этапе диафильтрации по существу отсутствуют;
- наблюдается определенная потеря фракций с наименьшей и средней ММ в фильтрате, при этом наибольшая доля потерь всегда приходится на наименьшую фракцию;
- процент потери наименьшей и средней фракций в ходе этапа диафильтрации соответственно снижается и повышается;
- в целом на этапе диафильтрации наблюдается определенное снижение и увеличение наименьшей фракции и средней/высокой фракций, соответственно (в соответствии с пределом отсечения мембраны ≤ 1 кДа).

Данные точечных образцов фильтрата P3, P4 и образца R2 в конце второго этапа концентрации показывают, что:

- потери фракции с наибольшей ММ в фильтрате на этом этапе по существу отсутствуют;
- наблюдается определенная потеря фракций с наименьшей и средней ММ в фильтрате, при этом наибольшая доля потерь всегда приходится на наименьшую фракцию (как и на этапе диафильтрации);
- процент потери средней фракции на этом втором этапе концентрации повышается (как и на этапе диафильтрации).

Пример 2

Выполняли способ по изобретению со следующими основными этапами:

- а) первая концентрация путем ТПФ для получения продукта с концентрацией гепарина от 4 % до 10 % в/о;
- б) обработка H_2O_2 ;
- с) вторая концентрация путем ТПФ для получения готового продукта с концентрацией гепарина от 10 % до 20 % в/о.

Приблизительно 1936 г исходного продукта переносили в емкость и запускали систему в режиме полной рециркуляции при ТМД = 3,2 бар на 10 минут при расходе поперечного потока 5,1 л/м²/мин.

На этапе концентрации расход фильтрата составлял от 9,6 л/м²/ч в начале до 4,2 л/м²/ч в конце этапа (44 %) при среднем расходе 6 л/м²/ч. Отбирали точечный образец фильтрата при VCF = 1,43 (P5), еще один образец фильтрата после завершения концентрации (P6) и наконец образец концентрата (R3) в конце этапа концентрации после работы фильтра в режиме полной рециркуляции при ТМД = 0,6 бар в течение 10 мин (деполяризации мембраны). Также отбирали образец исходного раствора (B2) перед переносом в емкость.

Приблизительно 794 г продукта переносили в емкость после обработки H_2O_2 и выполняли второй этап концентрации.

На этапе концентрации расход фильтрата составлял от 5,7 л/м²/ч в начале до 0,9 л/м²/ч в конце этапа (16,0 %) при среднем расходе 2,5 л/м²/ч. Отбирали 1 точечный образец фильтрата при VCF = 1,33 (P7) и еще один из объема фильтрата в конце этапа концентрации (P8). Также отбирали образец концентрата в конце концентрации (R4), после деполяризации мембраны путем поддержания работы системы при низком ТМД

(0,8 бар) в течение 10 минут.

Таблица 4. Молекулярная масса на этапах способа				
Образец	ММ, Да	<2000 Да, %	2000-8000 Да, %	>8000 Да, %
Сырой эноксапарин натрия	3646	24,9	70,6	4,5
B2 (осветление на фильтре Clarigard®)	3742	23,5	71,5	4,9
P5 (1-й образец фильтрата, 1-я концентрация)	< 600	---	---	---
P6 (2-й образец фильтрата, 1-я концентрация)	< 600	---	---	---
R3 (концентрат после первого этапа концентрации)	3784	23,1	71,5	5,4
P7 (1-й образец фильтрата, 2-я концентрация)	1311	90,8	9,2	0,0
P8 (2-й образец фильтрата, 2-я концентрация)	1476	84,4	15,6	0,0
R4 (концентрат после второго этапа концентрации)	4308	13,0	79,2	7,8

В Таблице 4 приведены значения молекулярной массы образцов, отобранных при выполнении вышеописанного способа, которые были проанализированы в соответствии со способом, установленным в Европейской фармакопее (Евр. фарм.).

Согласно данным, приведенным в таблице выше, представляется, что первый этап концентрации не оказывает отрицательного влияния на профиль продукта (отсутствуют потери любых фракций в фильтрате, образцах P5 и P6 и образцах P1 и P2).

Данные образцов фильтрата P7, P8 и образца из объема концентрата R4 в конце второго этапа концентрации показывают, что:

- потери фракции с наибольшей ММ в фильтрате на этом этапе отсутствуют;
- наблюдается определенная потеря фракций с наименьшей и средней ММ в фильтрате, при этом наибольшая доля потерь всегда приходится на наименьшую фракцию (как и на первом этапе диафильтрации);
- процент потери средней фракции на втором этапе концентрации повышается (как и на этапе диафильтрации).

В конце раствор концентрата лиофилизируют для получения сухого эноксапарина натрия.

Пример 3

Выполняли способ по изобретению со следующими основными этапами:

- а) первая концентрация путем ТПФ для получения продукта с концентрацией гепарина от 4 % до 10 % в/о;
- б) глубинная фильтрация;
- с) обработка H_2O_2 ;
- д) вторая концентрация путем ТПФ для получения готового продукта с концентрацией гепарина от 10 % до 20 % в/о.

Приблизительно 2000 г исходного продукта (мутность > 1000 НЕМ) переносили в емкость и запускали систему в режиме полной рециркуляции при ТМД = 3,2 бар на 15 минут при расходе поперечного потока 5,2 л/м²/мин.

На этапе концентрации расход фильтрата составлял от 9,6 л/м²/ч в начале до 3,9 л/м²/ч в конце этапа (41 % начального расхода) при среднем расходе 5,8 л/м²/ч. Отбирали образец фильтрата при VCF = 1,43 (P1') и еще один образец в конце этапа концентрации (P2'), а также образец концентрата (R1') в конце этапа концентрации после работы фильтра в режиме полной рециркуляции при ТМД = 0,7 бар в течение 15 мин (деполяризации мембраны). Также отбирали образец исходного раствора (B1') перед переносом в емкость.

Раствор R1' пропускали через глубинный фильтр Millistak +[®] HC Pro C0SP для снижения мутности до 0,57 НЕМ с последующей обработкой H_2O_2 . Приблизительно 0,8 литра продукта переносили в емкость после обработки H_2O_2 и выполняли второй этап концентрации.

Второй этап концентрации выполняли путем последовательного использования

аликвот концентрата и фильтрата от первоначальной номинальной концентрации 10 % (образцы R'3 и P'3, соответственно) до окончательной номинальной концентрации 20 % (образцы R'12 и P'12, соответственно) через промежуточные концентрации 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19 %.

В Таблице 5 ниже приведены значения молекулярной массы образцов, отобранных при выполнении вышеописанного способа, которые были проанализированы в соответствии со способом, установленным в Европейской фармакопее (Евр. фарм.).

Таблица 5. Молекулярная масса на этапах способа				
Образец	ММ, Да	<2000 Да, %	2000-8000 Да, %	>8000 Да, %
B1' (осветление на фильтре Clarigard®)	3464	29,6	65,95	4,50
P1' (1-й образец фильтрата, 1-я конц.)	< 600	---	---	---
P2' (2-й образец фильтрата, 1-я конц.)	< 600	---	---	---
R1' (концентрат после первого этапа концентрации)	3416	31,90	63,37	4,70
P3' (1-й образец фильтрата 11 %, 2-я конц.)	1054	100,00	0,00	0,00
P4' (1-й образец фильтрата 12 %, 2-я конц.)	945	99,20	0,77	0,00
P5' (1-й образец фильтрата 13 %, 2-я конц.)	999	98,40	1,59	0,00
P6' (1-й образец фильтрата 14 %, 2-я конц.)	1060	96,90	3,10	0,00
P7' (1-й образец фильтрата 15 %, 2-я конц.)	1139	94,20	5,76	0,00

Таблица 5. Молекулярная масса на этапах способа				
Образец	ММ, Да	<2000 Да, %	2000-8000 Да, %	>8000 Да, %
P8' (1-й образец фильтрата 16 %, 2-я конц.)	1197	92,20	7,82	0,00
P9' (1-й образец фильтрата 17 %, 2-я конц.)	1255	90,00	10,04	0,00
P10' (1-й образец фильтрата 18 %, 2-я конц.)	1288	88,70	11,29	0,00
P11' (1-й образец фильтрата 19 %, 2-я конц.)	1378	85,40	14,63	0,00
P12' (1-й образец фильтрата 20 %, 2-я конц.)	1330	87,20	12,84	0,00
R3' (1-й образец концентрата 11 %, 2-я конц.)	3744	24,6	69,9	5,6
R4' (1-й образец концентрата 12 %, 2-я конц.)	3757	24,3	70,0	5,7
R5' (1-й образец концентрата 13 %, 2-я конц.)	3795	23,5	70,8	5,8
R6' (1-й образец концентрата 14 %, 2-я конц.)	3827	22,6	71,6	5,9
R7' (1-й образец концентрата 15 %, 2-я конц.)	3881	21,5	72,4	6,1
R8' (1-й образец концентрата 16 %, 2-я конц.)	3937	20,2	73,5	6,3
R9' (1-й образец концентрата 17 %, 2-я конц.)	3994	18,9	74,7	6,4
R10' (1-й образец концентрата 18 %, 2-я конц.)	4005	18,4	75,1	6,4

Таблица 5. Молекулярная масса на этапах способа				
Образец	ММ, Да	<2000 Да, %	2000-8000 Да, %	>8000 Да, %
R11' (1-й образец концентрата 19 %, 2-я конц.)	4079	16,7	76,6	6,7
R12' (1-й образец концентрата 20 %, 2-я конц.)	4116	15,9	77,3	6,8

Изменчивость средней молекулярной массы и распределения молекулярной массы является линейной на 2-м этапе концентрации от 10 % до 20 % номинальной концентрации продукта в концентрате, так что путем корректировки окончательного значения концентрации продукта в растворе концентрата можно задать определенный профиль молекулярной массы и распределение олигосахаридных цепей для получения эноксапарина натрия. Этот факт отражен на Фиг. 5. В конце раствор концентрата лиофилизируют для получения сухого эноксапарина натрия.

Пример 4

Продукт, полученный в предыдущем примере, анализировали для определения его активности против факторов FXa и FIIa. Получены следующие результаты:

Активность против фактора FXa, МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество)	Активность против фактора FIIa, МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество)	Отношение активности против FXa/FIIa
112	29,5	3,8

Этот показатель качества в достаточной степени соответствует диапазонам, установленным в Европейской фармакопее и Фармакопее США для эноксапарина натрия:

- Активность против фактора FXa: 90 – 125 МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество)
- Активность против фактора FIIa: 20,0 – 35,0 МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество)

- Отношение активности против FXa/FIIa: 3,3 – 5,3

Пример 5

Выполняли способ по изобретению со следующими основными этапами:

a) диафильтрация;

b) обработка H_2O_2 ; и

c) концентрация путем ТПФ для получения готового продукта с концентрацией гепарина от 4 % до 15 % в/о.

Приблизительно 3010 г исходного продукта переносили в емкость и запускали систему в режиме полной рециркуляции при ТМД = 4,9 бар на 15 минут при расходе поперечного потока 2,0 л/м2/мин.

На этапе диафильтрации расход фильтрата составлял от 17,7 л/м2/ч в начале до 13,1 л/м2/ч в конце этапа при среднем расходе 12,6 л/м2/ч для 6 диаобъемов. После каждого объема диафильтрации отбирали образцы фильтрата (DP1 – DP6) и концентрата (DR1 – DR6). Фильтрат обрабатывали H_2O_2 , и приблизительно 2720 г обработанного продукта переносили в емкость.

На этапе концентрации расход фильтрата составлял от 12,7 л/м2/ч в начале до 1,28 л/м2/ч в конце этапа (снижение на 89,9 %) при среднем расходе 5,1 л/м2/ч. Выполняли концентрацию с 4 % до 15 % с отбором образцов фильтрата (CP1 – CP6) и концентрата (CR1 – CR6) от 10%. Отбирали 1 точечный образец фильтрата при VCF = 1,33 (P7) и еще один из объема фильтрата в конце этапа концентрации (P8). Также отбирали образец концентрата в конце концентрации (R4), после деполяризации мембраны путем поддержания работы системы при низком ТМД (0,8 бар) в течение 10 минут.

В Таблице 6 ниже приведены значения молекулярной массы образцов, отобранных при выполнении вышеописанного способа, которые были проанализированы в соответствии со способом, установленным в Европейской фармакопее (Евр. фарм.).

Таблица 6. Молекулярная масса на этапах способа				
Образец	ММ, Да	<2000 Да, %	2000-8000 Да, %	>8000 Да, %
DR1 (концентрат, 1 диаобъем)	3703	27,40	66,42	6,20
DR2 (концентрат, 2 диаобъема)	3770	26,10	67,51	6,40
DR3 (концентрат, 3 диаобъема)	3807	25,00	68,51	6,50
DR4 (концентрат, 4 диаобъема)	3841	24,10	69,36	6,50
DR5 (концентрат, 5 диаобъемов)	3856	23,50	69,93	6,50
DR6 (концентрат, 6 диаобъемов)	3884	22,90	70,40	6,70
CR1 (концентрат, концентрация 10 %)	3889	22,20	71,24	6,60
CR2 (концентрат, концентрация 11 %)	3912	21,60	71,77	6,60
CR3 (концентрат, концентрация 12 %)	3954	20,70	72,54	6,80
CR4 (концентрат, концентрация 13 %)	3967	20,10	73,08	6,80
CR5 (концентрат, концентрация 14 %)	3995	19,30	73,78	6,90
CR6 (концентрат, концентрация 15 %)	4029	18,50	74,54	7,00

Изменчивость средней молекулярной массы и распределения молекулярной массы является линейной от 10 % до 15 % номинальной концентрации продукта в концентрате, так что путем корректировки окончательного значения концентрации продукта в растворе концентрата можно задать определенный профиль молекулярной массы и распределение олигосахаридных цепей для получения эноксапарина натрия. Раствор концентрата лиофилизируют для получения сухого эноксапарина натрия.

Пример 6

Продукт, полученный в предыдущем примере, анализировали для определения его активности против факторов FХа и FПа. Получены следующие результаты:

Активность против фактора FХа, МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество)	Активность против фактора FПа, МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество)	Отношение активности против FХа/FПа
104	26,8	3,9

Ввиду предшествующего описания и примеров специалист в данной области техники может осуществить изобретение без необходимости проведения излишних экспериментов. Вышеуказанное будет хорошо понятно со ссылкой на предшествующие примеры, которые описывают определенные способы получения вариантов осуществления настоящего изобретения. Все ссылки на эти примеры приведены только для наглядности. Примеры не должны считаться ограничивающими и представляют собой только иллюстрации некоторых из множества возможных вариантов осуществления, предусмотренных настоящим изобретением.

Используемый в настоящем изобретении термин «приблизительно» означает $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 1\%$ указанного значения, предпочтительно $\pm 10\%$. Кроме того, все диапазоны, указанные в настоящем документе, включают в себя пределы диапазона и все целые и дробные значения, в частности, в соответствии с определением термина «приблизительно».

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения низкомолекулярных гепаринов (НМГ) со средним распределением молекулярной массы от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0 кДа, содержащий следующие этапы:

а) получение раствора сырого деполимеризованного гепарина с диапазоном распределения олигосахаридных цепей от приблизительно 0,6 до приблизительно 10 кДа и концентрацией гепарина до приблизительно 4 % в/о;

б) выполнение по меньшей мере одного этапа концентрации путем тангенциальной поточной фильтрации в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения 1 кДа до достижения концентрации гепарина до приблизительно 25 % в/о с получением таким образом упомянутого НМГ.

2. Способ по п. 1, в котором на этапе (б) выполняется первый этап концентрации путем ТПФ для достижения концентрации гепарина до приблизительно 10 % в/о и второй этап концентрации путем ТПФ для достижения концентрации гепарина от приблизительно 10 % до приблизительно 25 % в/о.

3. Способ по п. 2, в котором выполняется второй этап концентрации до концентрации гепарина от приблизительно 12 % до приблизительно 22 % в/о.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором выполняется этап осветления раствора гепарина, полученного на этапе а.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором выполняется по меньшей мере один этап глубинной фильтрации.

6. Способ по п. 5, в котором выполняется этап глубинной фильтрации перед этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется только один этап концентрации, или перед первым этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется больше одного этапа концентрации путем ТПФ.

7. Способ по п. 6, в котором выполняется этап глубинной фильтрации после этапа концентрации путем ТПФ, если выполняется только один этап концентрации, или перед первым этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется больше одного этапа концентрации путем ТПФ.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором выполняется по меньшей мере один этап диафильтрации водой.

9. Способ по п. 8, в котором выполняется этап диафильтрации перед этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется только один этап концентрации, или перед первым этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется больше одного этапа концентрации путем ТПФ.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором выполняется по меньшей мере один этап обработки H_2O_2 .

11. Способ по п. 10, в котором выполняется этап обработки H_2O_2 после этапа концентрации путем ТПФ, если выполняется только один этап концентрации, или перед первым этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется больше одного этапа концентрации путем ТПФ.

12. Способ по п. 10, в котором выполняется этап обработки H_2O_2 перед этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется только один этап концентрации, или перед первым этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется больше одного этапа концентрации путем ТПФ.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором выполняется этап лиофилизации полученного концентрата.

14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором сырой деполимеризованный гепарин не был получен фракционным осаждением.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором весь способ не включает в себя фракционное осаждение гепарина.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором молекулярная масса (ММ) полученного НМГ находится в следующих диапазонах:

	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-8000 Да, %	М3 >8000 Да, %
НМГ	3800-5000	12,0-20,0	68,0-82,0	≤18,0.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором молекулярная масса (ММ) сырого деполимеризованного гепарина находится в следующих диапазонах:

	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-8000 Да, %	М3 >8000 Да, %
сырой деполимеризованный гепарин	3000- 5000	≤25	60-80	≤20.

18. Способ по любому из пп. 1-15, в котором молекулярная масса (ММ) полученного НМГ находится в следующих диапазонах.

	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-6000 Да, %	М3 >6000 Да, %
НМГ	3000- 4200	<35,0	50,0-75,0	<15,0.

19. Способ по любому из пп. 1-15 или 18, в котором молекулярная масса (ММ) сырого деполимеризованного гепарина находится в следующих диапазонах.

	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-6000 Да, %	М3 >6000 Да, %
сырой деполимеризованный гепарин	2500- 5000	<40	50-75	<25.

20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором для концентрации путем тангенциальной поточной фильтрации (ТПФ) используется мембрана 0,7-1 кДа.

21. Способ по п. 20, в котором используется 0,9-1 кДа, предпочтительно 1 кДа.

22. Способ по любому из пп. 1-21, в котором гепарин представляет эноксапарин натрия.

ИЗМЕНЕННАЯ в соответствии со ст. 34 ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ К РАССМОТРЕНИЮ

1. Способ получения низкомолекулярных гепаринов (НМГ) со средним распределением молекулярной массы от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0 кДа, содержащий следующие этапы:

а) получение раствора сырого деполимеризованного гепарина с диапазоном распределения олигосахаридных цепей от приблизительно 0,6 до приблизительно 10 кДа и концентрацией гепарина до приблизительно 4 % в/о;

б) выполнение по меньшей мере одного этапа концентрации путем тангенциальной поточной фильтрации в водной фазе с использованием мембраны с номинальным пределом отсечения 1 кДа до достижения концентрации гепарина до приблизительно 25 % в/о с получением таким образом упомянутого НМГ,

при этом термин «приблизительно» означает $\pm 10\%$ от указанного значения.

2. Способ по п. 1, в котором на этапе (b) выполняется первый этап концентрации путем ТПФ для достижения концентрации гепарина до приблизительно 10 % в/о и второй этап концентрации путем ТПФ для достижения концентрации гепарина от приблизительно 10 % до приблизительно 25 % в/о,

при этом термин «приблизительно» означает $\pm 10\%$ от указанного значения.

3. Способ по п. 2, в котором выполняется второй этап концентрации до концентрации гепарина от приблизительно 12 % до приблизительно 22 % в/о,

при этом термин «приблизительно» означает $\pm 10\%$ от указанного значения.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором выполняется этап осветления раствора гепарина, полученного на этапе а.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором выполняется по меньшей мере один этап глубинной фильтрации.

6. Способ по п. 5, в котором выполняется этап глубинной фильтрации перед этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется только один этап концентрации, или ~~перед~~ после первого этапа концентрации путем ТПФ, если выполняется больше одного этапа концентрации путем ТПФ.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором выполняется по меньшей мере один этап диафильтрации водой.

8. Способ по п. 7, в котором выполняется этап диафильтрации перед этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется только один этап концентрации, или ~~перед~~ после первого этапа концентрации путем ТПФ, если выполняется больше одного этапа концентрации путем ТПФ.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором выполняется по меньшей мере один этап обработки H_2O_2 .

10. Способ по п. 9, в котором выполняется этап обработки H_2O_2 перед этапом концентрации путем ТПФ, если выполняется только один этап концентрации, или ~~перед~~ после первого этапа концентрации путем ТПФ, если выполняется больше одного этапа концентрации путем ТПФ.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором выполняется этап лиофилизации полученного концентрата.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором сырой деполимеризованный гепарин не был получен фракционным осаждением.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором весь способ не включает в себя фракционное осаждение гепарина.

14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором молекулярная масса (ММ) полученного НМГ находится в следующих диапазонах:

	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-8000 Да, %	М3 >8000 Да, %
НМГ	3800-5000	12,0-20,0	68,0-82,0	≤18,0.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором молекулярная масса (ММ) сырого деполимеризованного гепарина находится в следующих диапазонах:

	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-8000 Да, %	М3 >8000 Да, %
сырой деполимеризованный гепарин	3000- 5000	≤25	60-80	≤20.

16. Способ по любому из пп. 1-13, в котором молекулярная масса (ММ) полученного НМГ находится в следующих диапазонах:

	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-6000 Да, %	М3 >6000 Да, %
НМГ	3000-4200	<35,0	50,0-75,0	<15,0.

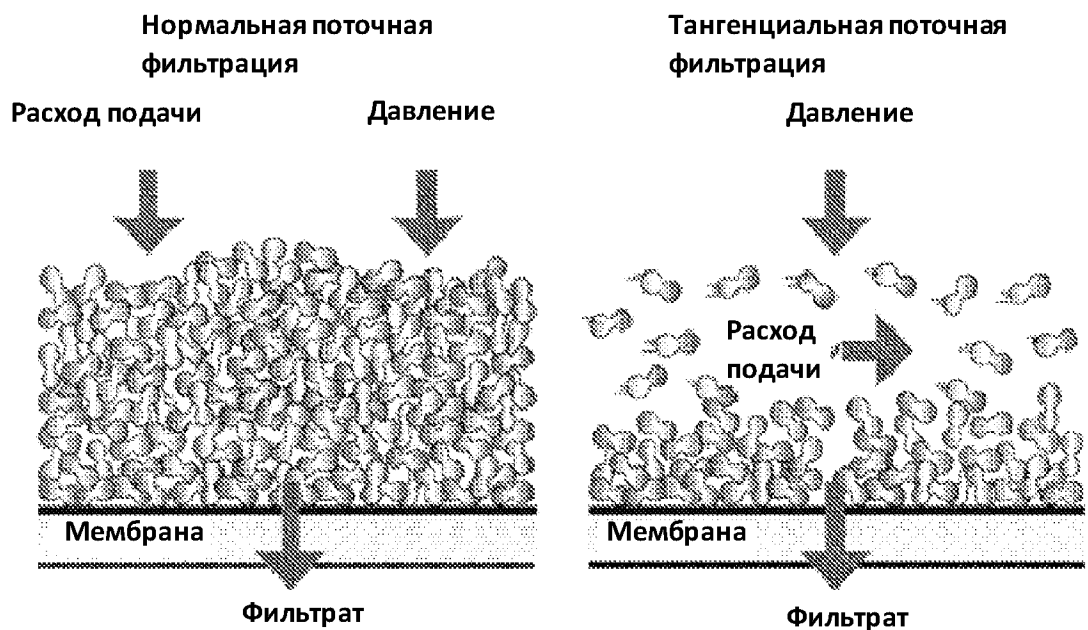
17. Способ по любому из пп. 1-13, 16, в котором молекулярная масса (ММ) сырого деполимеризованного гепарина находится в следующих диапазонах:

	ММ, Да	М1 <2000 Да, %	М2 2000-6000 Да, %	М3 >6000 Да, %
сырой деполимеризованный гепарин	2500-5000	<40	50-75	<25.

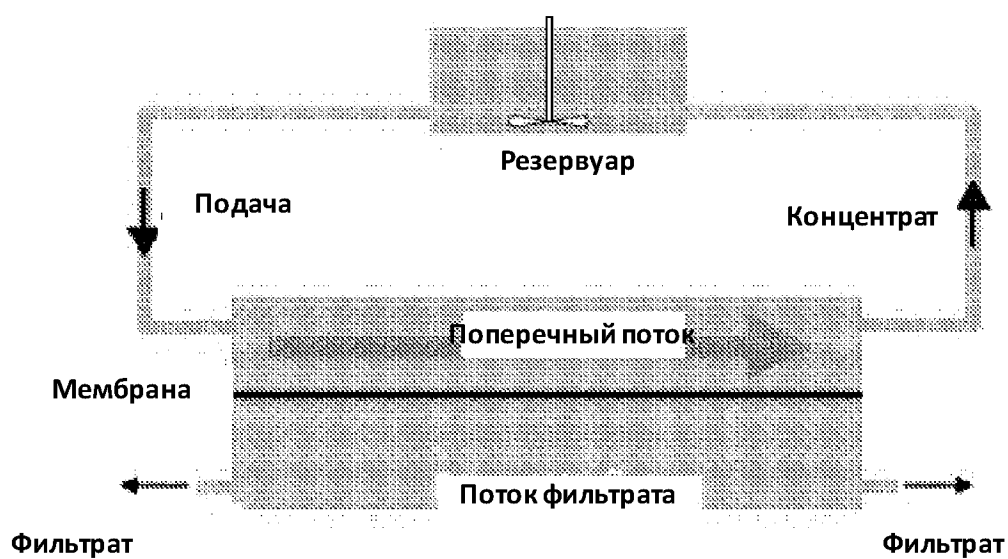
18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором для концентрации путем тангенциальной поточной фильтрации (ТПФ) используется мембрана 0,7-1 кДа.

19. Способ по п. 18, в котором используется 0,9-1 кДа, предпочтительно 1 кДа.

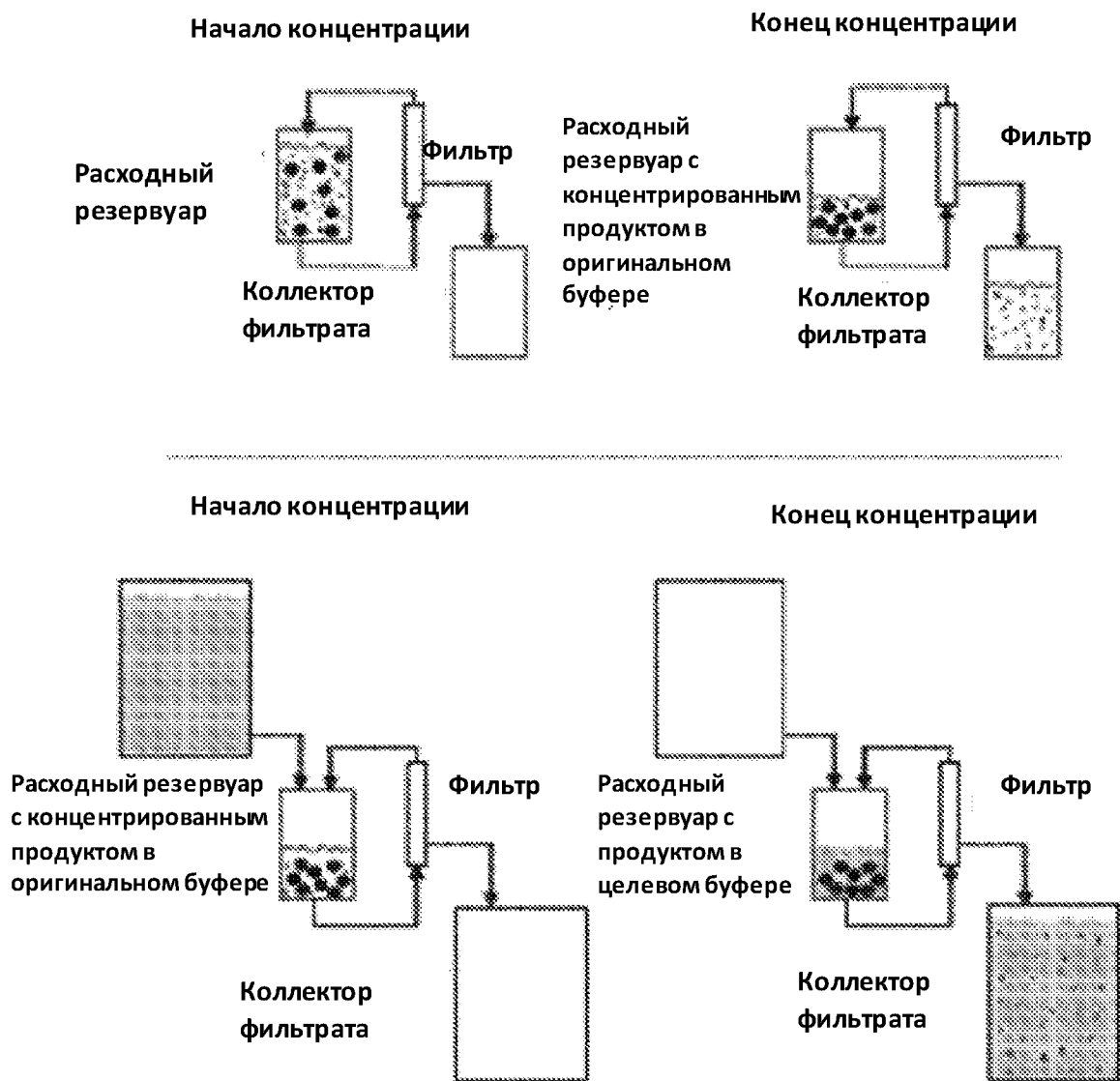
20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором гепарин представляет эноксапарин натрия.



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3

Сырой эноксапарин натрия 4 % в/о



Эноксапарин натрия

* Этап диафильтрации может быть выполнен до или после первого этапа концентрации путем ТПФ.

** Этап осветления может быть выполнен до или после первого этапа концентрации путем ТПФ.

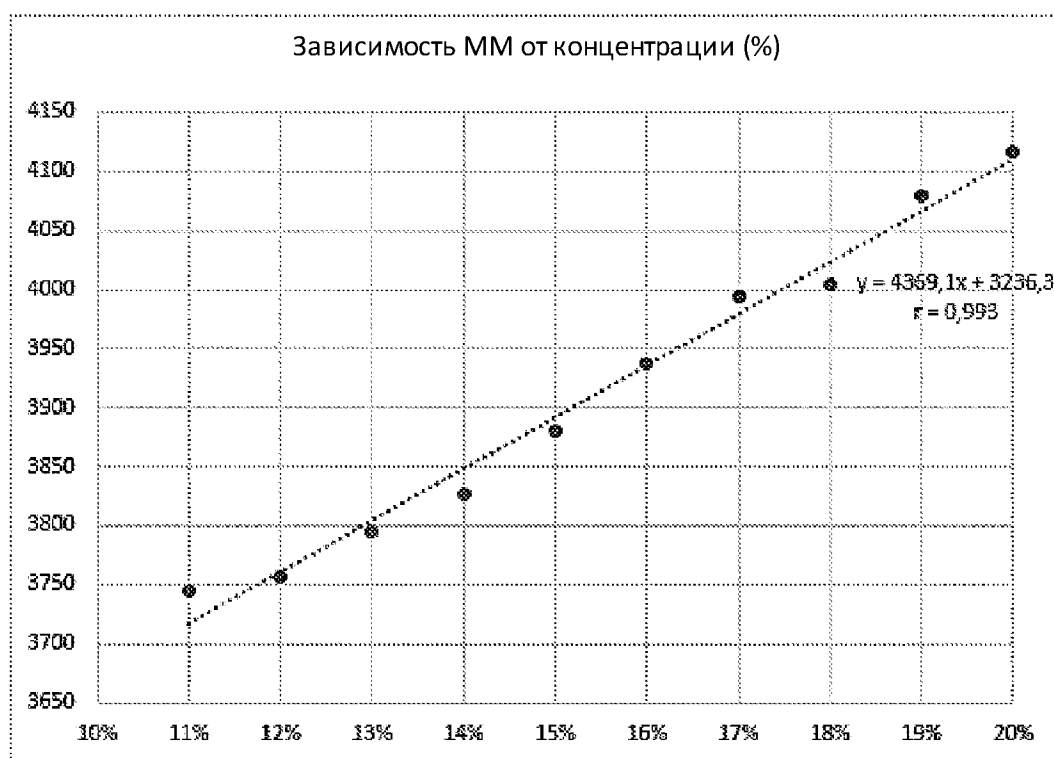
ФИГ. 4А

Сырой эноксапарин натрия 4 % в/о

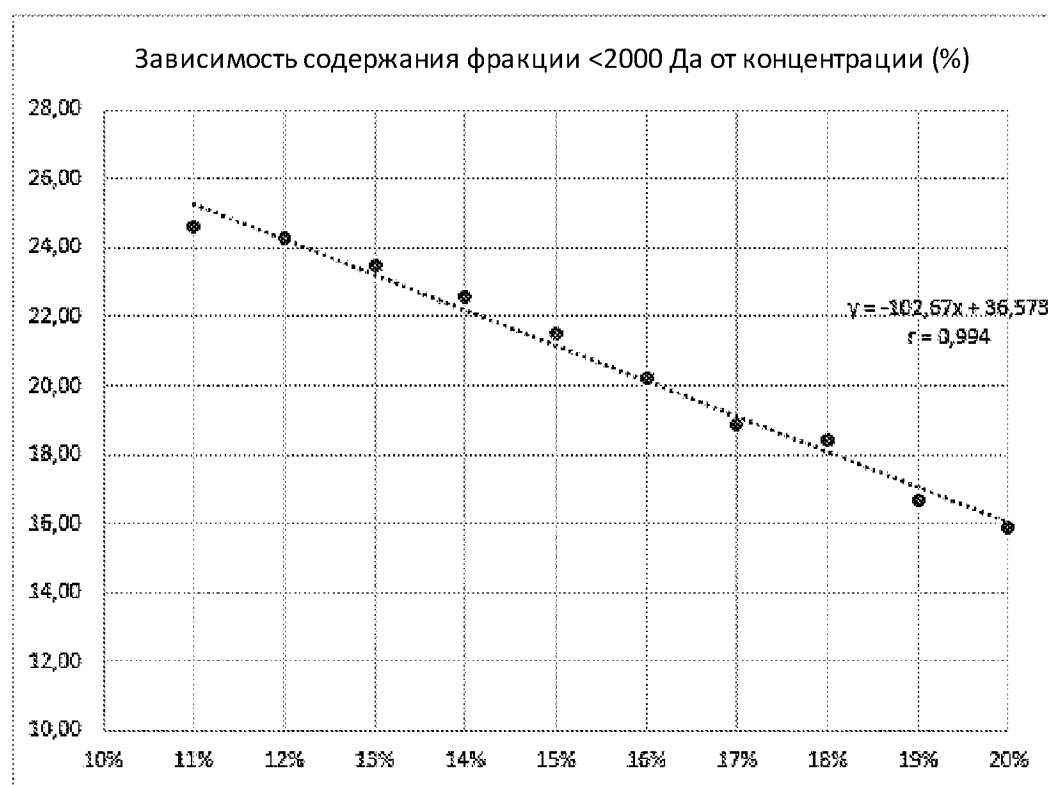


Эноксапарин натрия

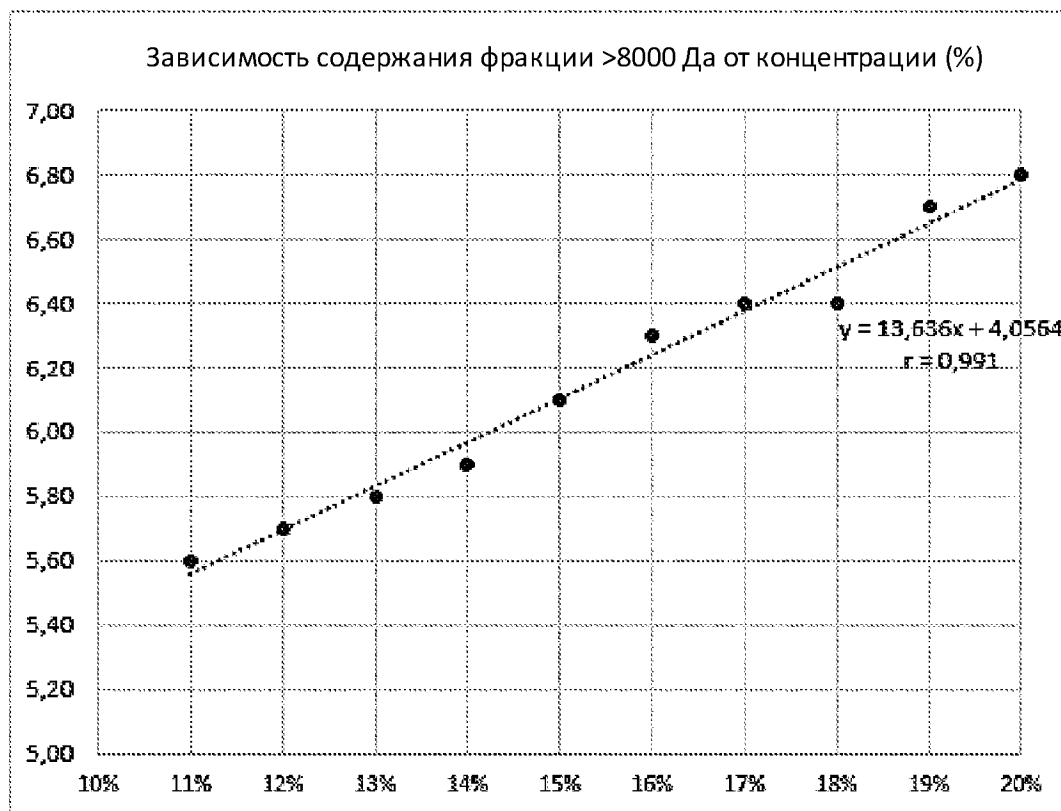
ФИГ. 4В



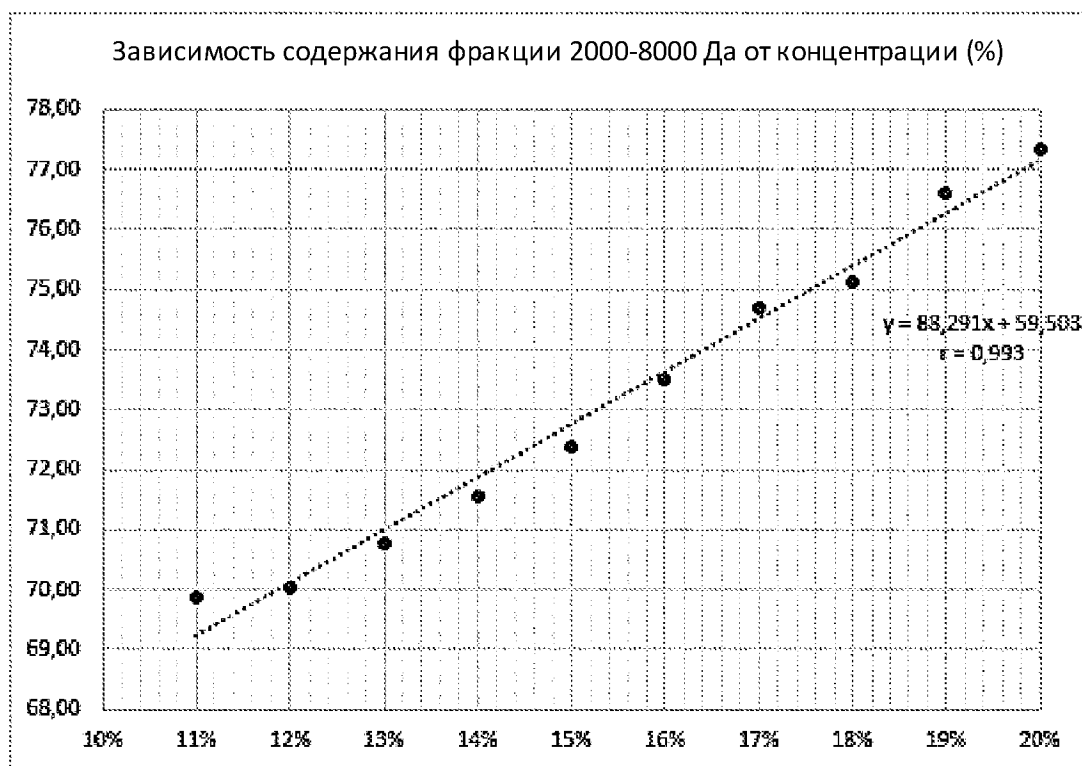
ФИГ. 5А



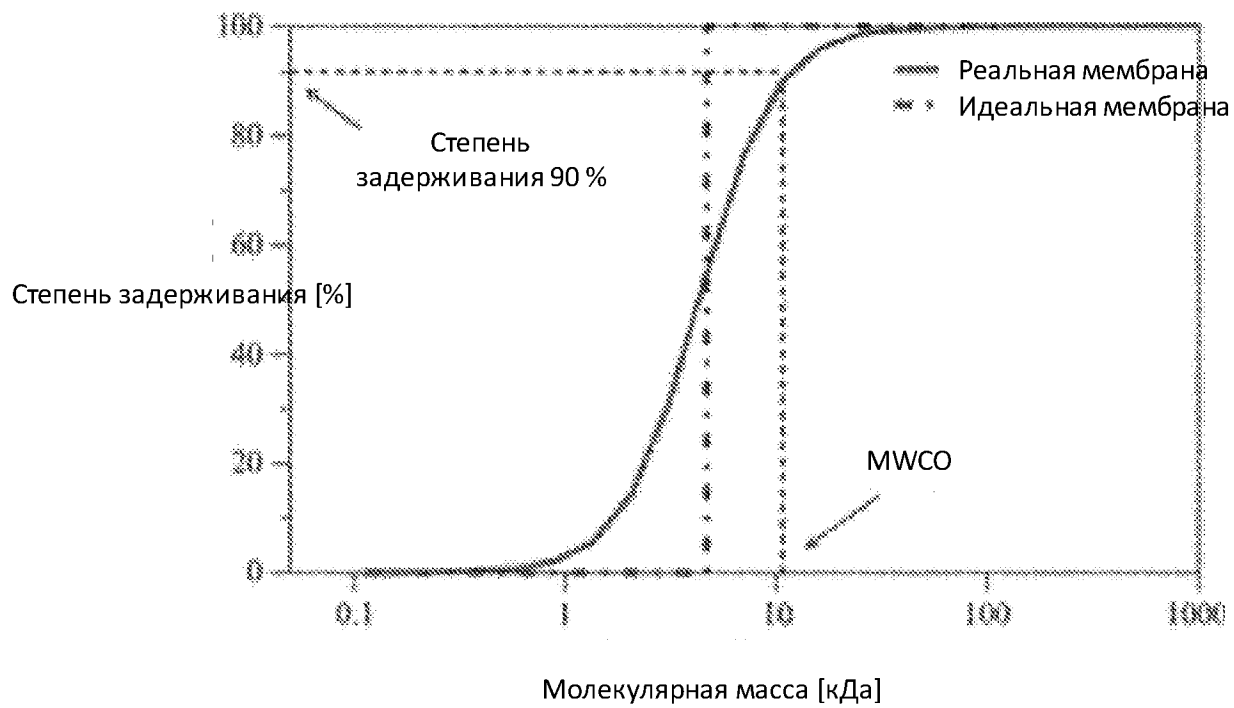
ФИГ. 5В



ФИГ. 5С



ФИГ. 5D



ФИГ. 6