

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292690 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.29

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

(22) Дата подачи заявки
2020.11.10

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЕПАРИНОВ И ГЕПАРИНОВ,
ПОЛУЧЕННЫХ ТЕМ ЖЕ СПОСОБОМ

(31) PCT/ES2020/070271

(32) 2020.04.27

(33) ES

(86) PCT/ES2020/070695

(87) WO 2021/219907 2021.11.04

(71) Заявитель:

ЛАБОРАТОРИОС

ФАРМАСЕУТИКОС РОВИ, С.А. (ES)

(72) Изобретатель:

Франко Родригез Гильермо, Гутьеро
Адуриз Ибон (ES)

(74) Представитель:

Мягкова Е.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу получения низкомолекулярных гепаринов, которые обладают высокой стабильностью. Способ включает обработку деполимеризованного гепарина H₂O₂ в соотношении от 0,04 до 1,0 л H₂O₂ 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина. Изобретение также относится к гепарину, полученному этим способом.

A1

202292690

202292690

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЕПАРИНОВ И ГЕПАРИНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ТЕМ ЖЕ СПОСОБОМ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения низкомолекулярных гепаринов (НМГ) и к низкомолекулярным гепаринам, полученным тем же способом.

Уровень техники

Гепарин - это полисахарид семейства гликозаминогликанов, состоящий из уроновой кислоты (L-идуроновой кислоты или D-глюкуроновой кислоты) и D-глюкозамина, попеременно связанных между собой. L-идуроновая кислота может быть 2-О-сульфатированной, а D-глюкозамин может быть N-сульфатированным и/или 6-О-сульфатированным, и в меньшей степени N-ацетилированным или 3-О-сульфатированным. Гепарин предпочтительно используется в виде натриевой соли, но может также использоваться в виде соли других щелочных или щелочноземельных металлов и в основном применяется в качестве антитромботического и антикоагулянтного препарата.

Гепарины можно классифицировать на основе их молекулярной массы как нефракционированный гепарин (НФГ), НМГ и гепарин с очень низкой молекулярной массой (ОНМГ). НМГ и ОНМГ получены в результате деполимеризации исходной молекулы НФГ.

В настоящее время технически описаны различные способы получения НМГ. Один из них соответствует щелочной деполимеризации по механизму β -элиминации.

EP0040144 описывает процесс получения НМГ с помощью способа, включающего стадии трансалкилирования соли гепарина до гепарината бензетония, этерификации гепарината бензетония бензилхлоридом, очистки и получения натриевой соли бензилового эфира гепарина, деполимеризации гидроксидом натрия с омылением сложного эфира и очистки продукта.

EP1070503 описывает процесс получения НМГ с помощью способа, включающего стадии трансалкилирования соли гепарина в гепаринат бензалкония, деполимеризации в неводной среде с Triton B и очистки продукта.

EP2881404 описывает процесс получения НМГ, включающий первый этап трансалкилирования, деполимеризацию с фосфазеновым основанием или

основанием, полученным из гуанидина, и заключительный этап трансалкилирования.

Существует потребность в более воспроизводимых и стабильных процессах, которые позволяют получать НМГ, особенно НМГ с более высокой стабильностью.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения нашли способ приготовления низкомолекулярных гепаринов (НМГ), которые демонстрируют превосходную стабильность при сохранении хорошей анти-FXa и анти-FIIa активности. Этот метод получения НМГ включает обработку сырого деполимеризованного гепарина H_2O_2 при расходе от 0,04 до 1,0 литра H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина.

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к способу получения низкомолекулярных гепаринов со средней молекулярной массой от 3 до 3,8 кДа, включающему следующие стадии:

- a) приготовление водного раствора гепарина натрия;
- b) добавление хлорида бензалкония к раствору этапа (a), чтобы получить гепаринат бензалкония;
- c) растворение гепарината бензалкония, полученного на этапе (b), в Cl_2CH_2 , добавление Triton B и выдержка при 20-40°C в течение 24-48 часов; и
- d) выполнение по меньшей мере двух обработок H_2O_2 деполимеризованного гепарина, полученного на этапе (c), из расчета от 0,04 до 1,0 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина, для каждой обработки.

Второй аспект изобретения относится к низкомолекулярному гепарину, получаемому способом по изобретению.

Было установлено, что содержание 1,6-ангидроостатков в полученных НМГ составляет от 1 до 15%. Таким образом, третий аспект изобретения относится к низкомолекулярному гепарину со средней молекулярной массой от 3 до 3,8 кДа, имеющему содержание 1,6-ангидроостатков от 1 до 15% на восстановительном конце его олигосахаридных цепей.

Определения и варианты осуществления, описанные для одного аспекта, в равной степени применимы ко всем другим аспектам изобретения.

В настоящем изобретении "низкомолекулярный гепарин" или "НМГ" определяется в монографии «Гепарины, низкомолекулярная масса» («Heparins, Low-Molecular-Mass»), 0828, Европейская фармакопея 9-е изд. как смесь полисахаридов, полученная из гепарина и имеющая среднюю молекулярную массу менее 8000 дальтон и в котором по крайней мере 60% от общей массы имеет молекулярную массу менее 8000 Да. Средняя молекулярная масса НМГ по изобретению была определена по способу Европейской фармакопеи (Европейская фармакопея 9-е издание).

В настоящем изобретении под "1,6-ангидро остатками" понимаются различные химические группы, которые образуются в терминальных положениях НМГ в процессе деполимеризации. Неограничивающими примерами этих групп являются 2-сульфо-амино-1,6-ангидро-2-дезокс-β-D-глюкопираноза (1,6-ангидро-глюкозамин) и 2-сульфо-амино-1,6-ангидро-2-дезокс-β-D-маннопираноза (1,6-ангидроманозамин). Количество этих остатков в НМГ выражается как процент олигосахаридных цепей с этими типами остатков на их восстановительном конце.

Содержание в 1,6-безводных концах НМГ может быть получено с помощью аналитического метода, описанного в монографии «Эноксапарин натрия» («Enoxaparin Sodium»), 1097, Европейская фармакопея, 9-е изд., описанной в разделе Идентификация В. В этом методе молекула интенсивно деполимеризуется смесью гепариназ I, II и III, а образовавшиеся остатки разделяются и количественно определяются с помощью хроматографии сильного анионного обмена (SAX-HPLC). Содержание 1,6-ангидро, например, определяется по следующей формуле:

$$\% \text{ 1,6-ангидро} = Mw \cdot (A_1 + A_2 + A_3) \cdot 100 / \sum Mw_x \cdot A_x$$

в котором:

- Mw, средневесовая молекулярная масса
- Лапки Mw_x , молекулярная масса производного x (см. таблицу 1097-1 в монографии «Эноксапарин натрия» («Enoxaparin Sodium»), 1097, Европейская фармакопея, 9-е изд.)
- A_x , площадь пика производной x
- A_1 , площадь пика 1,6-ангидропроизводного ΔIS

- A_2 , площадь пика производного 1,6-ангидропроизводного ΔIS
- A_3 , площадь пика 1,6-ангидропроизводного $\Delta IS-IS$

Доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина и 1,6-ангидроманозамина в НМГ может быть определена с помощью ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), например, путем 1H ^{13}C HSQC. Соотношение между двумя остатками может быть определено путем интегрирования сигналов, соответствующих каждому из этих остатков в спектре 1H ^{13}C HSQC.

Анти-FXa и анти-FIIa активность НМГ по изобретению была определена с помощью хромогенного способа Европейской фармакопеи (Европейская фармакопея 9-е издание, Монография 0828) и была выражена в международных единицах по мг.

Степень окрашенности НМГ может быть определена в соответствии с методом II Европейской фармакопеи, глава 2.2.2.

Термин “температура окружающей среды” относится к температуре от 20 до 25°C.

Как используется в настоящем документе, термин "приблизительно" означает $\pm 10\%$ от заданного значения.

НМГ по настоящему изобретению имеет среднюю молекулярную массу (Mw) от 3 до 3,8 кДа, предпочтительно от 3 до 3,6 кДа.

В одном варианте осуществления изобретения НМГ имеет содержание 1,6-ангидро остатков от 1 до 15% на восстановительном конце своих олигосахаридных цепей; предпочтительно от 2 до 13%, более предпочтительно от 4 до 11%.

Предпочтительно молярная доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина в НМГ по настоящему изобретению больше или равна молярной доле остатков 1,6-ангидроманозамина. В конкретном варианте осуществления молярное соотношение остатков 1,6-ангидроглюкозамина и остатков 1,6-ангидроманозамина в НМГ составляет от 1:1 до 3:1, предпочтительно от 1:1 до 2,5:1 или от 1,05:1 до 2,5: 1.

В конкретном варианте осуществления изобретения НМГ имеют среднюю молекулярную массу от 3 до 3,8 кДа, содержание 1,6-ангидро-остатков от 1 до 15% на восстановительном конце их олигосахаридных цепей и соотношение 1,6-ангидроглюкозаминовых остатков больше или равно соотношению 1,6-ангидроманозаминовых остатков, предпочтительно от 1:1 до 3:1.

Предпочтительно, НМГ по настоящему изобретению проявляет анти-FXa-активность в диапазоне 80-120 МЕ/мг и анти-FIIa-активность в диапазоне 5-20

МЕ/мг. В одном конкретном варианте осуществления они проявляют анти-FХa-активность в диапазоне 95-120 МЕ/мг и анти-FIIa-активность в диапазоне 10-20 МЕ / мг.

В конкретном варианте осуществления изобретения НМГ имеют среднюю молекулярную массу от 3 до 3,8 кДа, содержание 1,6-ангидро-остатков от 1 до 15% на восстановительном конце их олигосахаридных цепей и соотношение 1,6-ангидроглюкозаминовых остатков больше или равно соотношению 1,6-ангидроманозаминовых остатков, предпочтительно от 1: 1 и 3:1, анти-FХa активность в пределах 80-120 МЕ/мг и анти-FIIa активность в пределах 5-20 МЕ/мг.

Предпочтительно, чтобы НМГ по настоящему изобретению имела степень окрашивания, большую или равную 6, в диапазоне эталонных цветовых растворов, установленных в Европейской Фармакопее, глава 2.2.2. (метод II) в течение не менее 24 месяцев, предпочтительно не менее 36 месяцев, при комнатной температуре и относительной влажности 60%. Это определение может быть выполнено в соответствии с методом, описанным в Европейской Фармакопее (глава 2.2.2; метод II), или автоматически с помощью колориметра.

Было отмечено, что НМГ по настоящему изобретению обладают высокой стабильностью. В частности, было обнаружено, что они стабильны не менее 24 месяцев или даже не менее 36 месяцев при комнатной температуре и относительной влажности 60%.

В одном аспекте изобретение относится к способу получения низкомолекулярных гепаринов со средней молекулярной массой от 3 до 3,8 кДа, включающему следующие этапы:

- a) приготовление водного раствора гепарина натрия;
- b) добавление хлорида бензалкония к раствору этапа (a), чтобы получить гепаринат бензалкония;
- c) растворение гепаринат бензалкония, полученного на стадии (b), в CH_2Cl_2 , добавление Triton В и выдержка при 20 до 40 ° С в течение 24-48 часов; и
- d) выполнение по меньшей мере двух обработок H_2O_2 деполимеризованного гепарина, полученного после этапа c), из расчета от 0,04 до 1,0 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина, для каждой обработки.

Конкретные и предпочтительные варианты реализации низкомолекулярного гепарина описаны выше в этой статье.

В конкретном воплощении водный раствор гепарина натрия на этапе а) готовят из гепарина, полученного из слизистой оболочки кишечника свиньи.

Добавление Triton В на этапе с) может быть осуществлено путем одного или нескольких последовательных добавлений, например, путем 1, 2, 3 или 4 последовательных добавлений Triton В.

В конкретном воплощении добавление Triton В на этапе с) осуществляется максимум тремя последовательными добавлениями, то есть, 1, 2 или 3, каждое с добавлением Triton В в весовом соотношении от 0,2:1 до 0,3:1 Triton В: гепаринат бензалкония. Предпочтительно добавление Triton В на стадии с) проводят тремя последовательными добавлениями Triton В, и предпочтительно каждое из них с добавлением Triton В в весовом соотношении от 0,2:1 до 0,3:1 Triton В: бензалкония гепарината.

В варианте осуществления изобретения добавление Triton В на стадии с) осуществляется путем трех последовательных добавлений Triton В, таким образом, что после первого добавления реакция поддерживается в течение 6-10 часов до второго добавления, после второго добавления реакция поддерживается в течение 12-20 часов до третьего добавления, и после третьего добавления реакция поддерживается в течение 6-10 часов. В другом варианте осуществления после первого добавления реакция поддерживается в течение 7-9 часов до второго добавления, после второго добавления реакция поддерживается в течение 14-18 часов до третьего добавления, а после третьего добавления реакция поддерживается в течение 7-9 часов. В другом дополнительном варианте осуществления время реакции после первого, второго и третьего добавления составляет примерно 8, примерно 16 и примерно 8 часов соответственно.

В одном варианте осуществления температура на стадии с) составляет от 25 до 35 ° С, предпочтительно от 27 до 32 ° С.

В предпочтительном воплощении обработку H_2O_2 на этапе d) проводят на водном растворе деполимеризованного гепарина.

Предпочтительно, каждая обработка H_2O_2 на этапе d) проводится при расходе от 0,04 до 0,5 литров H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина, более предпочтительно от 0,04 до 0,3 литров H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного

гепарина. В конкретном варианте осуществления каждую обработку H_2O_2 на стадии d) проводят из расчета от 0,04 до 0,2 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина. В предпочтительном варианте осуществления стадия d) включает первую обработку деполимеризованным гепарином H_2O_2 , полученным после стадии c), в соотношении от 0,05 до 0,25 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина, и вторая обработка с использованием H_2O_2 в соотношении от 0,04 до 0,25 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина.

В другом варианте осуществления стадия d) включает в себя три процедуры с H_2O_2 .

Предпочтительно этап d) проводят при температуре от 20 до 50 ° C, предпочтительно от 25 до 45 ° C.

Предпочтительно каждую обработку H_2O_2 проводить в течение не менее 3 часов. Например, от 3 до 20 часов. В конкретном варианте первая обработка H_2O_2 проводится в течение 12-20 ч, предпочтительно 14-18 ч. Предпочтительно вторую и последующие обработки H_2O_2 проводят в течение 3-7 ч, предпочтительно 4-6 ч.

В предпочтительном варианте осуществления стадию d) проводят при pH от 10,5 до 11,5. Кроме того, способ по изобретению может включать дополнительную стадию осаждения деполимеризованного гепарина в метаноле после каждой обработки H_2O_2 на стадии d). В конкретном варианте осуществления проводят две обработки H_2O_2 и проводят стадию осаждения деполимеризованного гепарина в метаноле между двумя обработками H_2O_2 . В другом варианте осуществления проводят три обработки H_2O_2 и проводят стадию осаждения деполимеризованного гепарина в метаноле между первой и второй обработками H_2O_2 и между второй и третьей обработками H_2O_2 .

Предпочтительно, после первой обработки H_2O_2 на этапе d) деполимеризованный гепарин осаждают в растворе ацетата натрия в метаноле.

В предпочтительном варианте осуществления НМГ, полученная в способе по изобретению, очищается осаждением метанолом.

Полученный НМГ можно подвергнуть сублимационной сушке.

Краткое описание чертежей

Фиг.1. Спектр ^1H ЯМР НМГ, полученного по способу изобретения, с расширением аномерной зоны.

Фиг.2. Спектр ^1H ^{13}C HSQC НМГ, полученного по способу изобретения, с расширением аномерной зоны.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Примеры

Приведенные ниже конкретные примеры служат для иллюстрации сущности настоящего изобретения. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны интерпретироваться как ограничение заявленного здесь изобретения.

Пример 1

10 г гепарина натрия растворяют в очищенной воде и при перемешивании добавляют раствор 50 % (мас./об.) хлорида бензалкония с образованием гепарината бензалкония. Сформованный продукт несколько раз промывают водой для удаления избытка хлоридов и, наконец, высушивают сублимационной сушкой.

Бензалкония гепаринат растворяют в метиленхлориде и регулируют температуру до 30 ± 5 °C. Бензилтриметиламмоний гидроксид (Triton B) добавляют при 40% мас./об. в метаноле при массовом соотношении 0,25:1 к Triton B:бензалкония гепаринату и оставляют для реакции при указанной выше температуре. Добавление повторяют еще два раза, оставляя первое добавление Triton B на 8 часов, второе - на 16 часов, а третье - еще на 8 часов.

При растворении деполимеризованного продукта и при pH от 10,5 до 11,5 добавляется H_2O_2 33% мас./об., в частности, добавляется $0,1 \pm 10\%$ литров H_2O_2 33% мас./об./кг бензалкония гепарината, и дают прореагировать при 30% мас./об. ± 5 °C в течение более 3 часов (от 14 до 18 часов). По истечении времени реакции его осаждают при растворении ацетата натрия в метаноле, выделяя неочищенный низкомолекулярный гепарин центрифугированием.

Этот неочищенный низкомолекулярный гепарин растворяют в воде и снова осаждают метанолом. Осадок растворяют в очищенной воде и обрабатывают H_2O_2 33% мас./об./кг, а именно добавляют $0,08 \pm 10\%$ литров H_2O_2 33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре 40 ± 2 °C в течение более 3 часов (около 5 часов). По истечении периода реакции раствор нейтрализуется и осаждается метанолом.

Осадок повторно растворяют в очищенной воде и снова обрабатывают $0,05 \pm 10\%$ литра H_2O_2 33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре 40 °C ± 2 °C в

течение более 3 часов (около 5 часов). По истечении периода реакции раствор нейтрализуется и осаждается метанолом.

Концентрация гепарината бензалкония в растворе, в котором проводится как деполимеризация, так и первая обработка перекисью водорода, составляет 20% по массе/объему $\pm$ 2% в этом и во всех других примерах, если не указано иное. Количество перекиси водорода, добавляемого на разных стадиях, эквивалентно количеству как бензалкония гепарината, так и деполимеризованного гепарина, поскольку при различных добавлениях Triton В присутствующий в реакции бензалкония гепаринат деполимеризуется, образуя деполимеризованный гепарин.

Очищенный продукт растворяют в воде и проводят лиофилизацию, получая 6,00 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3241 Да, анти-FXa-активностью 118 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 13,7 МЕ/мг и присутствует на восстановительном конце его олигосахаридных цепей содержание 1,6-безводных остатков от 1 до 15%, в котором доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или равна доле остатков 1,6-ангидроманозамина, в отличие от других низкомолекулярных гепаринов.

Этот низкомолекулярный гепарин, кроме того, обладает тем преимуществом, что стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашенности $\geq$ 6, измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который определяет цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)).

Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев.

Пример 2

Начиная с 10 г гепарина натрия и повторяя шаги, указанные в примере 1, получают 6,01 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3259 Да, анти-FXa-активностью 103 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 15,2 МЕ/мг. Этот низкомолекулярный гепарин отличается тем, что на восстановительном конце его олигосахаридных цепей содержание 1,6-безводных остатков составляет от 1 до 15%, в котором доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина выше, чем доля остатков 1,6-ангидроманозамина. В отличие от других низкомолекулярных гепаринов.

Этот низкомолекулярный гепарин, кроме того, обладает тем преимуществом, что стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашенности ≥ 6 , измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который определяет цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)).

Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев.

Пример 3

10 г гепарина натрия растворяют в очищенной воде и при перемешивании добавляют раствор 50 % (мас./об.) хлорида бензалкония с образованием гепарината бензалкония. Сформованный продукт несколько раз промывают водой для удаления избытка хлоридов и, наконец, высушивают сублимационной сушкой.

Бензалкония гепаринат растворяют в метилхлориде и регулируют температуру до $30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Бензилтриметиламмоний гидроксид (Triton B) добавляют при 40% мас./об. в метаноле при массовом соотношении 0,25:1 к Triton B:бензалкония гепаринату и оставляют для реакции при указанной выше температуре. Добавление повторяют еще два раза, оставляя первое добавление Triton B на 8 часов, второе - на 16 часов, а третье - еще на 8 часов.

При растворении деполимеризованного продукта и при pH от 10,5 до 11,5 добавляется H_2O_2 33% мас./об., в частности, добавляется $0,1 \pm 10\%$ литров H_2O_2 33% мас./об./кг бензалкония гепарината, и дают прореагировать при $30\% \text{ мас. / об.} \pm 5^{\circ}\text{C}$ в течение 16 часов. По истечении времени реакции его осаждают при растворении ацетата натрия в метаноле, выделяя неочищенный низкомолекулярный гепарин центрифугированием.

Этот неочищенный низкомолекулярный гепарин растворяют в воде и снова осаждают метанолом. Осадок растворяют в очищенной воде и обрабатывают H_2O_2 33% мас./об./кг, а именно добавляют $0,08 \pm 10\%$ литров H_2O_2 33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$. По истечении 5 часов реакции раствор нейтрализуется и осаждается метанолом.

Очищенный продукт растворяют в воде и проводят лиофилизацию, получая 5,21 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3269 Да, анти-FXa-активностью 119 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 13,70 МЕ/мг. и присутствует на

восстановительном конце его олигосахаридных цепей содержание 1,6-безводных остатков от 1 до 15%, в котором доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или равна доле остатков 1,6-ангидроманозамина, в отличие от других низкомолекулярных гепаринов.

Этот низкомолекулярный гепарин, кроме того, обладает тем преимуществом, что стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашенности ≥ 6 , измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который определяет цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)).

Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев.

Пример 4

Начиная с 10 г гепарина натрия и повторяя шаги, указанные в примере 1, получают 6,25 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3172 Да, анти-FXa-активностью 108 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 13,1 МЕ/мг и более высокий профиль активности. 1,6-безводных остатков на восстановительном конце его олигосахаридных цепей от 1 до 15%, в котором доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или эквивалентна доле остатков 1,6-ангидроманозамина, в отличие от других низкомолекулярных гепаринов, таких как эноксапарин.

Этот низкомолекулярный гепарин, кроме того, обладает тем преимуществом, что стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашенности ≥ 6 , измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который определяет цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)).

Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев.

Пример 5

Начиная с 10 г гепарина натрия и повторяя шаги, указанные в примере 1, получают 6,34 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3347 Да, анти-FXa-активностью 110 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 14,7 МЕ/мг и более высокий

профиль активности. 1,6-безводных остатков на восстановительном конце его олигосахаридных цепей от 1 до 15%, в котором доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или эквивалентна доле остатков 1,6-ангидроманозамина, в отличие от других низкомолекулярных гепаринов, таких как эноксапарин.

Этот низкомолекулярный гепарин, кроме того, обладает тем преимуществом, что стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашенности ≥ 6 , измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который определяет цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)). Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев.

Пример 6

Начиная с 10 г гепарина натрия и повторяя шаги, указанные в примере 1, получают 7,11 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3400 Да, анти-FXa-активностью 119 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 15,0 МЕ/мг и более высокий профиль активности. 1,6-безводных остатков на восстановительном конце его олигосахаридных цепей от 1 до 15%, в котором доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или эквивалентна доле остатков 1,6-ангидроманозамина, в отличие от других низкомолекулярных гепаринов, таких как эноксапарин.

Этот низкомолекулярный гепарин, кроме того, обладает тем преимуществом, что стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашенности ≥ 6 , измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который определяет цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)). Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев.

Пример 7

Начиная с 10 г гепарина натрия и повторяя шаги, указанные в примере 1, получают 6,92 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3328 Да, анти-

FXa-активностью 117 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 14,9 МЕ/мг и более высокий профиль активности. 1,6-безводных остатков на восстановительном конце его олигосахаридных цепей от 1 до 15%, в котором доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или эквивалентна доле остатков 1,6-ангидроманозамина, в отличие от других низкомолекулярных гепаринов, таких как эноксапарин.

Этот низкомолекулярный гепарин, кроме того, обладает тем преимуществом, что стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашенности ≥ 6 , измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который определяет цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)). Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт стабилен в течение 24-36 месяцев.

Пример 8

Начиная с 10 г гепарина натрия и повторяя шаги, указанные в примере 3, получают 7,04 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3331 Да, анти-FXa-активностью 113 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 15,3 МЕ/мг и более высокий профиль активности. 1,6-безводных остатков на восстановительном конце его олигосахаридных цепей от 1 до 15%, в котором доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или эквивалентна доле остатков 1,6-ангидроманозамина, в отличие от других низкомолекулярных гепаринов, таких как эноксапарин.

Этот низкомолекулярный гепарин, кроме того, обладает тем преимуществом, что стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашенности ≥ 6 , измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который определяет цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)). Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев.

Пример 9

Начиная с 10 г гепарина натрия и повторяя шаги, указанные в примере 3, получают 7,09 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3366 Да, анти-FXa-активностью 115 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 16,0 МЕ/мг и более высокий профиль активности. 1,6-безводных остатков на восстановительном конце его олигосахаридных цепей от 1 до 15%, в котором доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или эквивалентна доле остатков 1,6-ангидроманозамина, в отличие от других низкомолекулярных гепаринов, таких как эноксапарин.

Этот низкомолекулярный гепарин, кроме того, обладает тем преимуществом, что стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашенности ≥ 6 , измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который определяет цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)). Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев.

Сравнительный пример 10 (без обработки с H_2O_2)

10 г гепарина натрия растворяют в очищенной воде и при перемешивании добавляют раствор 50 % (мас./об.) хлорида бензалкония с образованием гепарината бензалкония. Сформованный продукт несколько раз промывают водой для удаления избытка хлоридов и, наконец, высушивают сублимационной сушкой.

Бензалкония гепаринат растворяют в метиленхлориде и регулируют температуру до 30 ± 5 °C. Бензилтриметиламмоний гидроксид (Triton B) добавляют при 40% мас./об. в метаноле при массовом соотношении 0,25:1 к Triton B:бензалкония гепаринату и оставляют для реакции при указанной выше температуре. Добавление повторяют еще два раза, оставляя первое добавление Triton B на 8 часов, второе - на 16 часов, а третье - еще на 8 часов.

Раствор деполимеризованного продукта осаждают при растворении ацетата натрия в метаноле, при этом неочищенный низкомолекулярный гепарин выделяют центрифугированием.

Этот неочищенный низкомолекулярный гепарин растворяют в воде и снова осаждают метанолом. Осадок растворяется в очищенной воде при температуре $40 \pm$

2 °С при рН 11. По истечении 5 часов раствор нейтрализуется и осаждается метанолом.

Очищенный продукт растворяют в воде и проводят лиофилизацию, получая 5,28 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 3280 Да, анти-FХа-активностью 112 МЕ/мг и анти-FIIа-активностью 13,70 МЕ / мг. и присутствует на восстановительном конце его олигосахаридных цепей содержание 1,6-безводных отходов составляет 18,5 %.

Кроме того, анализируется соотношение остатков 1,6-ангидроглюкозамина и остатков 1,6-ангидроманозамина, в отличие от предыдущих примеров, остатки 1,6-ангидроманозамина больше, чем остатки 1,6-ангидроглюкозамина.

Далее анализируется степень стабильности, коррелирующая с цветом образца, отмечая, что начиная с десятого месяца при комнатной температуре он имеет цветовую степень 4, измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который связывает цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)).

Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт не был стабильным в течение более 9 месяцев при комнатной температуре, поэтому добавки H_2O_2 , по-видимому, ответственны за это поведение.

Сравнительный пример 11 (деполимеризация при 60 °С)

10 г гепарина натрия растворяют в очищенной воде и при перемешивании добавляют раствор 50 % (мас./об.) хлорида бензалкония с образованием гепарината бензалкония. Сформованный продукт несколько раз промывают водой для удаления избытка хлоридов и, наконец, высушивают сублимационной сушкой.

Гепаринат бензокалия растворяют в хлористом метиле и регулируют температуру до 60 ± 5 °С. Бензилтриметиламмоний гидроксид (Triton В) добавляют при 40% мас./об. в метаноле при массовом соотношении 0,25:1 к Triton В:бензалкония гепаринату и оставляют для реакции при указанной выше температуре. Добавление повторяют еще два раза, оставляя первое добавление Triton В на 8 часов, второе - на 16 часов, а третье - еще на 8 часов.

При растворении деполимеризованного продукта и при рН от 10,5 до 11,5 добавляется перекись водорода с концентрацией 33% мас./об./кг, в частности, $0,1 \pm 10\%$ литра H_2O_2 добавляют с концентрацией 33% мас./об./кг бензалкония гепарината

и оставляют для реакции при 30 ± 5 °C на 16 часов. По истечении времени реакции его осаждают при растворении ацетата натрия в метаноле, выделяя неочищенный низкомолекулярный гепарин центрифугированием.

Этот неочищенный низкомолекулярный гепарин растворяют в воде и снова осаждают метанолом. Осадок растворяют в очищенной воде и обрабатывают перекисью водорода 33% мас./об./кг, а именно добавляют $0,08 \pm 10\%$ литра H_2O_2 33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре 40 ± 2 °C. По истечении 5 часов реакции раствор нейтрализуется и осаждается метанолом.

Осадок повторно растворяют в очищенной воде и снова обрабатывают $0,05 \pm 10\%$ литра H_2O_2 33% мас./об./кг бензалкония гепарината H_2O_2 33% мас./об./кг при температуре $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ в течение примерно 5 часов. По истечении периода реакции раствор нейтрализуется и осаждается метанолом. Очищенный продукт растворяют в воде и проводят лиофилизацию, получая 5,10 г низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 2341 Да, анти-FXa-активностью 109 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 2,8 МЕ / мг. и присутствует на восстановительном конце его олигосахаридных цепей содержание 1,6-безводных остатков составляет 21 %, в котором доля 1,6-ангидроглюкозаминовых остатков намного ниже, чем у 1,6-ангидроманозаминовых остатков.

Далее анализируется степень стабильности, коррелирующая с цветом образца, отмечая, что начиная с десятого месяца при комнатной температуре он имеет цветовую степень 4, измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который связывает цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Европейская фармакопея (2.2.2, Метод II)).

Степень окрашенности, параметр, напрямую связанный со стабильностью продукта, позволил определить, что конечный упакованный продукт не был стабильным в течение более 10-11 месяцев при комнатной температуре, что требовало холодной цепи для обеспечения стабильности продукта более 12 месяцев.

Пример 12

Продукты, полученные в примерах с 1 по 11, анализируют на процентное содержание 1,6-безводных остатков конкретным способом в соответствии с методом, описанным в монографии «Эноксапарин натрия» («Enoxaparin Sodium

monograph»), 1097, Европейская Фармакопея 9-е изд., описанный в разделе Идентификация В, получены следующие результаты.

Пример	Средняя молекулярная масса Da	Содержание 1,6-ангидрида, %
1	3241	8
2	3259	9
3	3269	11
4	3172	8
5	3347	7
6	3400	5
7	3328	5
8	3331	4
9	3366	4
10	3280	18,5
11	2341	21

Пример 13

Продукт, полученный в примере 1, анализируется методом ядерного магнитного резонанса, в частности, с помощью экспериментов ^1H -ЯМР и ^1H - ^{13}C HSQC.

Спектроскопия ^1H -ЯМР была наиболее широко используемым методом для изучения этих соединений из-за их богатых ядер и высокого гироманнитного отношения. Область между 1,8 - 2,1 промилле содержит сигналы, соответствующие N-ацетильным или метильным группам восстановительных окончаний, которые могут быть включены синтетически. Область между 2,8 – 4,6 промилле содержит большинство сигналов сахаридного кольца и имеет высокую степень перекрытия между ними, что затрудняет извлечение структурной информации непосредственно из этой области. Между 4,6 - 6,0 промилле находятся сигналы, соответствующие аномерным протонам. Поскольку это гораздо менее населенная сигналами область, из нее можно извлечь много полезной информации. Кроме того, в случае НМГ, полученных с помощью механизма β -элиминации, они также содержат сигналы, соответствующие H4, с невозстанавливающих концов молекулы.

В частности, сигналы, соответствующие остаткам 1,6-ангидро, появляются при 5,57 и 5,62 промилле, что соответствует аномерному протону структур 1,6-

ангидроманозамина и 1,6-ангидроглюкозамина, соответственно, и как описано в литературе.

Другим двумерным экспериментом, имеющим особое значение для структурной характеристики соединений этого типа, является ^1H - ^{13}C HSQC (Гетероядерная одноквантовая корреляция), который коррелирует химические сдвиги протонов с химическими сдвигами углерода-13 и позволяет сопоставить первичные структуры олигосахаридов, полученных из GAGs, и моносахаридный состав.

Увеличение спектральной дисперсии, достигаемое с помощью этого двумерного метода, позволяет количественно определять интегралы сигналов, которые перекрываются в соответствующих одномерных спектрах.

Сигналы, соответствующие 1,6-безводным остаткам, появляются при 5,57-103,9 и 5,61-104,3 промилле, что соответствует аномерному протону 1,6-ангидроманозаминовой и 1,6-ангидроглюкозаминовой структур, соответственно, и как описано в литературе и как показано на рисунках 1 и 2 для образца продукта получено в примере 1.

Пример 14

Продукты, полученные в примерах с 1 по 11, анализировали на содержание остатков 2-сульфоамино-1,6-безводной-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы (1,6-ангидроглюкозамина или 1,6-ан.А) и 2-сульфоамино-1,6-ангидро-2-дезоксид-β-D-манопиранозу (1,6-ангидроманозамина или 1,6-М) в соответствии с способом, известном в современном мире для экспериментов с ^1H - ^{13}C HSQC, получены следующие результаты.

Пример	1,6-ан.А, % мол. (относительная доля)	1,6-ан.М, % мол. (относительная доля)	Соотношение 1,6-ан.А 1,6-ан.М
1	0,61	0,54	1,13
2	0,74	0,62	1,19
3	0,97	0,88	1,10
4	0,66	0,50	1,31
5	0,51	0,38	2,13
6	0,26	0,23	1,13
7	0,25	0,20	1,25
8	0,16	0,08	2,00

9	0,17	0,16	1,06
10	1,21	1,43	0,85
11	1,40	1,70	0,82

Пример 15: воспроизведение примера 1 из EP1070503 и того же примера с добавлением обработки перекисью водорода

Пример 1, описанный в EP1070503, был воспроизведен в том виде, в каком он описан, и с одним вариантом: добавление после деполимеризации Triton В двух стадий обработки перекисью водорода при pH от 10,5 до 11,5, в котором на первой стадии добавляли 0,08 литра H₂O₂ 33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре 40 ± 2 ° С (5 часов реакции) и на второй стадии 0,05 л H₂O₂ 33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре 40 ° С ± 2 ° С в течение примерно 5 часов.

При воспроизведении примера 1 EP1070503 был получен низкомолекулярный гепарин, который имел на восстановительном конце своих олигосахаридных цепей содержание 1,6-ангидро остатков 0,3 %, в то время как при добавлении двух стадий обработки перекисью водорода, описанных выше, это содержание составляло 6 %. Кроме того, остатки 1,6-ангидроманозамина больше, чем остатки 1,6-ангидроглюкозамина, при воспроизведении примера 1 EP1070503, тогда как при обработке перекисью водорода, описанной выше, молярная доля остатков 1,6-ангидроманозамина была больше или равна молярной доле остатков 1,6-ангидроманозамина.

Воспроизводя пример 1 из EP1070503 и анализируя степень стабильности, коррелирующую с цветом образца, было замечено, что начиная с десятого месяца при комнатной температуре он имеет цветовую степень 4, измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который связывает цвет в соответствии с эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопея (Фармакопея фармакопея (2.2.2, Метод II)). Однако при обработке пероксидом, описанной выше, было обнаружено, что полученный продукт стабилен при комнатной температуре в течение 24-36 месяцев, демонстрируя степень окрашивания ≥ 6, измеренную с помощью колориметра марки LICO®, который связывает цвет в соответствии с

эталонным цветовым диапазоном, установленным в Фармакопее (Фармакопея фармакопея (2.2.2, Метод II)).

Пример 16:

Примеры 1 и 3 повторяли, варьируя добавленные количества перекиси водорода, которые всегда варьировались при каждой обработке от 0,04 до 1,0 л H_2O_2 33% мас./об./кг гепарината бензалкония (или деполимеризованного гепарина) и в промежутках от 3 до 20 часов.

Первичная обработка*	Вторичная обработка*	Третья обработка*
0,2 в течение 3 часов	0,2 в течение 3 часов	-
0,3 в течение 3 часов	0,3 в течение 3 часов	-
0,5 в течение 3 часов	0,5 в течение 3 часов	-
0,6 в течение 3 часов	0,6 в течение 3 часов	-
0,8 в течение 3 часов	0,8 в течение 3 часов	-
0,04 в течение 20 часов	0,04 в течение 20 часов	0,04 в течение 20 часов
0,08 в течение 18 часов	0,08 в течение 7 часов	0,08 в течение 7 часов
0,1 в течение 16 часов	0,1 в течение 5 часов	0,1 в течение 5 часов
0,25 в течение 14 часов	0,25 в течение 4 часов	0,25 в течение 4 часов
0,1 в течение 16 часов	0,08 в течение 5 часов	0,05 в течение 5 часов
0,04 в течение 18 часов	0,05 в течение 7 часов	-

*литры H_2O_2 33% мас./об./кг бензалкония гепарината

Во всех случаях полученные гепарины показали среднюю молекулярную массу от 3 до 3,8 кДа и анти-FXa-активность от 80 до 120 МЕ/мг и анти-FIIa-активность от 5 до 20 МЕ/мг.

Аналогичным образом, во всех случаях полученные гепарины представляли на восстановительном конце своих олигосахаридных цепей содержание 1,6-ангидро остатков от 1 до 15%, а доля 1,6-ангидроглюкозаминовых остатков была больше или равна доле 1,6-ангидроманогаминовых остатков.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения низкомолекулярных гепаринов со средней молекулярной массой от 3 до 3,8 кДа, включающая следующие этапы:

- а) приготовление водного раствора гепарина натрия;
- б) добавление хлорида бензалкония к раствору этапа (а), чтобы получить гепаринат бензалкония;
- в) растворение гепарината бензалкония, полученного на этапе (б), в Cl_2CH_2 , добавление Triton В и выдержка при 20-40°C в течение 24-48 часов; и
- г) выполнение по меньшей мере двух обработок H_2O_2 деполимеризованного гепарина, полученного после этапа в), из расчета от 0,04 до 1,0 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина, для каждой обработки.

в котором стадия (г) проводится при pH от 10,5 до 11,5 и предпочтительно в течение не менее 3 часов при каждой обработке с H_2O_2 .

2. Способ по п. 1, в котором добавление Triton В на этапе (в) осуществляется максимум тремя последовательными добавлениями, каждое добавление Triton В в весовом соотношении от 0,2:1 до 0,3:1 Triton В:гепаринат бензалкония.

3. Способ по п. 1 или п.2, в котором температура этапа (в) составляет от 25 до 35 °С, предпочтительно от 27 до 32 °С.

4. Способ по любому из п.п. 1-3, в котором стадия (в) содержит три последовательных добавления Triton В, так что после первого добавления реакция поддерживается в течение 6-10 часов до второго добавления, после второго добавления реакция поддерживается в течение 12-20 часов до третьего добавления, а после третьего добавления реакция сохраняется в течение 6-10 часов.

5. Способ по любому из п.п. 1-4, в котором каждая обработка H_2O_2 на стадии г) проводится с соотношением от 0,04 до 0,5 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина, предпочтительно от 0,04 до 0,3 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина.

6. Способ по любому из п.п. 1-5, в котором стадию (d) проводят при температуре от 20 до 50 ° C, предпочтительно от 25 до 45 ° C.
7. Способ по любому из п.п. 1-6, в котором стадия d) включает первую обработку деполимеризованным гепарином H_2O_2 , полученным после стадии c), в соотношении от 0,05 до 0,25 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина и вторая обработка H_2O_2 из расчета от 0,04 до 0,25 л H_2O_2 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина.
8. Способ по любому из п.п. 1-7, в котором деполимеризованный гепарин осаждают в метаноле между каждой стадией обработки с H_2O_2 .
9. Способ по любому из п.п. 1-8, в котором полученный низкомолекулярный гепарин очищают осаждением метанолом.
10. Способ по любому из п.п. 1-9, в котором полученный низкомолекулярный гепарин подвергается сублимационной сушке.
11. Низкомолекулярный гепарин со средней молекулярной массой от 3 до 3,8 кДа, полученный способом по любому из п.п. 1-10.
12. Низкомолекулярный гепарин по п. 11, отличающийся тем, что он имеет на восстановительном конце своей олигосахаридной цепи содержание 1,6-ангидро остатков от 1 до 15 %, предпочтительно от 4 до 11 %.
13. Низкомолекулярный гепарин по п. 11 или п. 12, в котором молярная доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или равна молярной доле остатков 1,6-ангидроманозамина.
14. Низкомолекулярный гепарин по любому из п.п. 11-13, отличающийся тем, что обладает анти-FXa-активностью в диапазоне 80-120 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью в диапазоне 5-20 МЕ/мг.

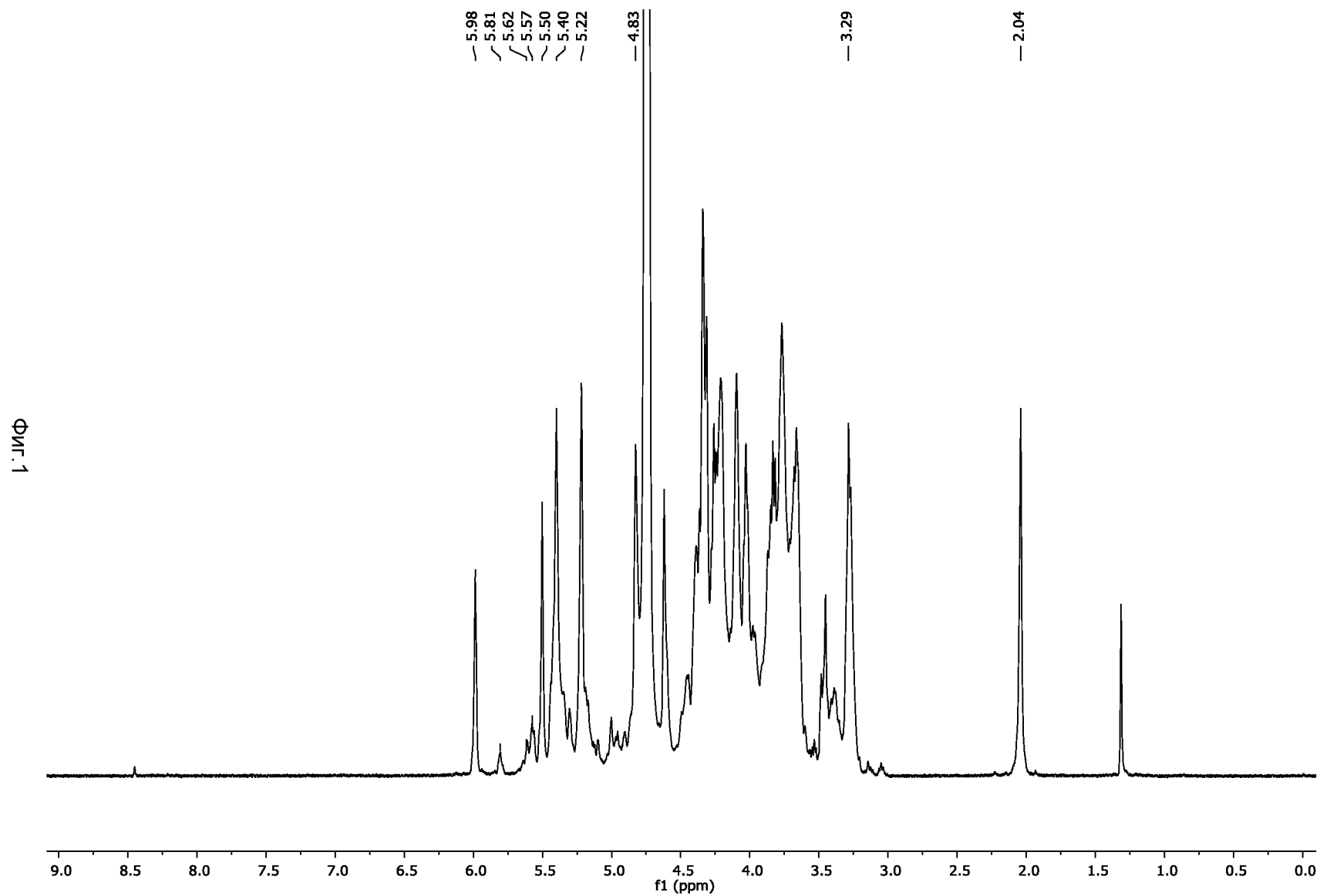
15. Низкомолекулярный гепарин по любому из п.п. 11-14, в котором указанный гепарин имеет степень окрашивания, превышающую или равную 6, в диапазоне эталонных растворов для окрашивания, установленных в Европейской Фармакопее 2.2.2. Метод II, в течение не менее 24 месяцев, предпочтительно в течение не менее 36 месяцев, при комнатной температуре.

16. Низкомолекулярный гепарин со средней молекулярной массой от 3 до 3,8 кДа, отличающийся тем, что на восстановительном конце своих олигосахаридных цепей он имеет содержание 1,6-ангидро остатков от 1 до 15%, предпочтительно от 4 до 11 %.

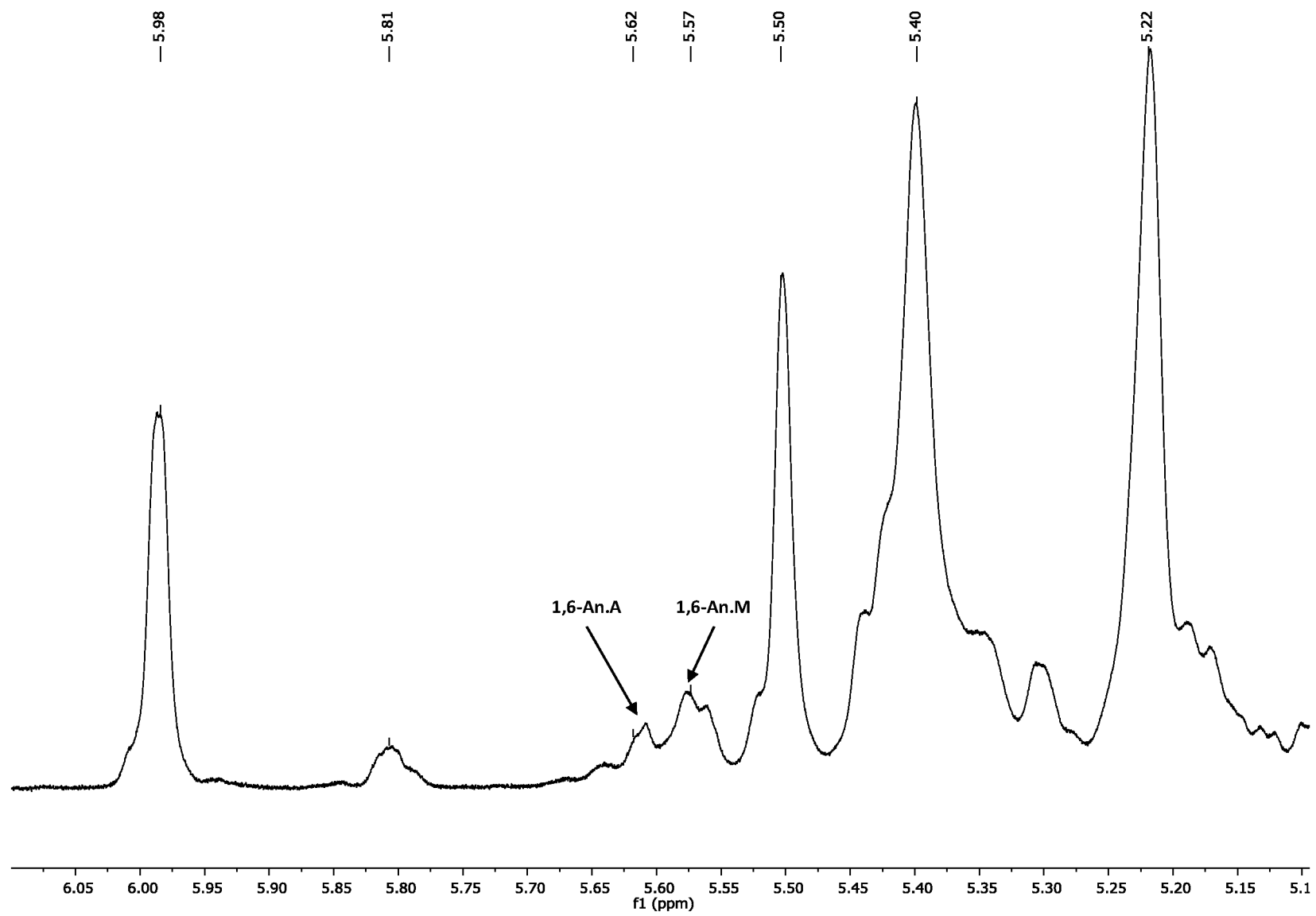
17. Низкомолекулярный гепарин по п. 16, в котором молярная доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или равна доле остатков 1,6-ангидроманозамина.

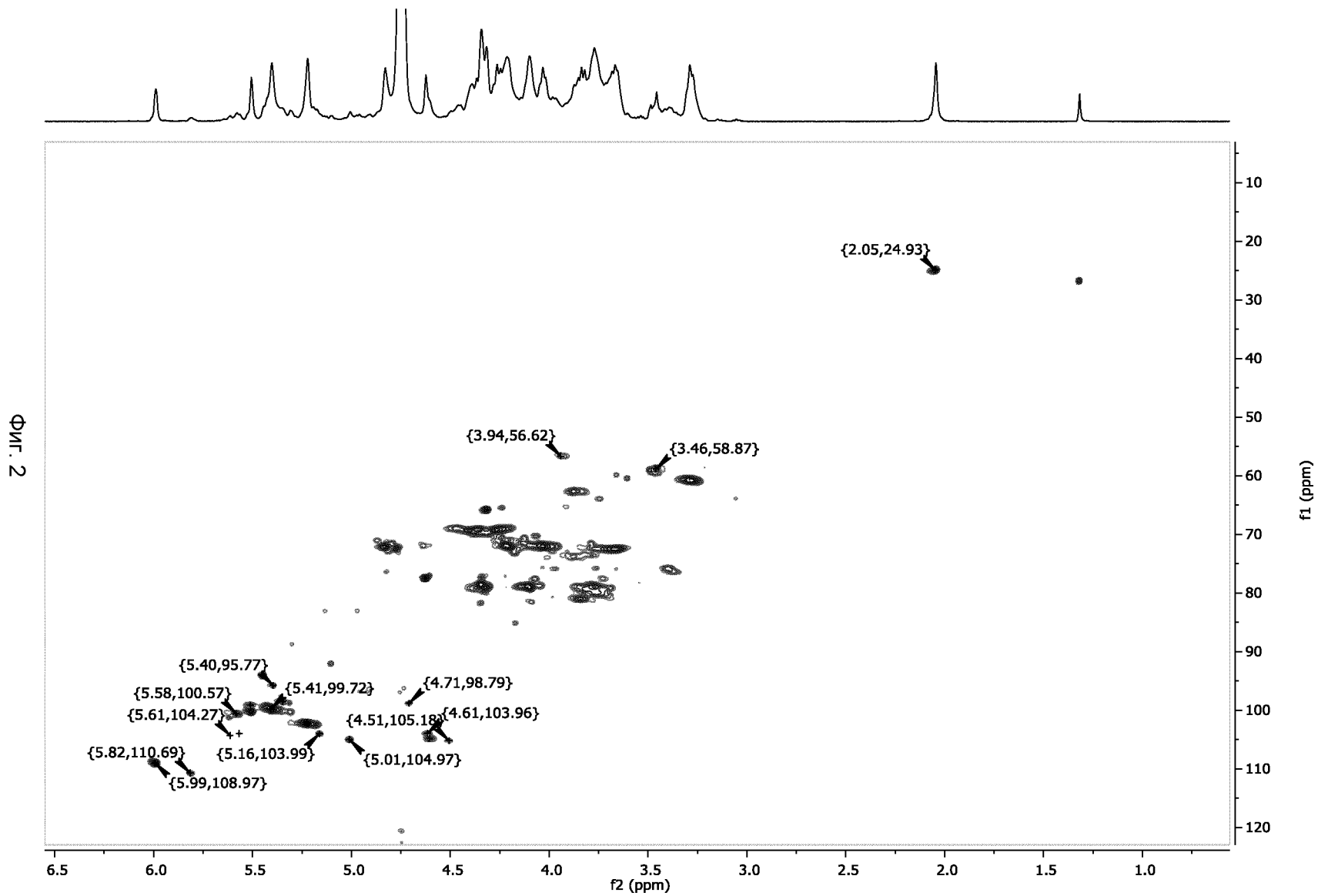
18. Низкомолекулярный гепарин по п. 16 или п. 17, отличающийся тем, что обладает анти-FXa-активностью в диапазоне 80-120 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью в диапазоне 5-20 МЕ/мг.

19. Низкомолекулярный гепарин по любому из п.п. 16-18, в котором указанный гепарин имеет степень окрашивания, превышающую или равную 6, в диапазоне эталонных растворов для окрашивания, установленных в Европейской Фармакопее 2.2.2. Метод II, в течение не менее 24 месяцев, предпочтительно в течение не менее 36 месяцев, при комнатной температуре.



Фиг. 1 (продолжение).





Фиг. 2 (продолжение).

