

## PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR POR FILTRACIÓN DE FLUJO TANGENCIAL

### Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de heparinas de bajo  
5 peso molecular con una distribución de peso molecular concreta, que comprende al  
menos una etapa de concentración por filtración de flujo tangencial. Aparte de la  
concentración por filtración de flujo tangencial, el procedimiento puede englobar otras  
etapas como la diafiltración o el tratamiento con peróxido de hidrógeno. Por tanto, la  
presente invención se puede incluir en el sector de la tecnología farmacéutica.

### 10 Antecedentes de la invención

La heparina es un polisacárido de la familia de los glicosaminoglicanos, formado por  
ácido urónico (ácido L-idurónico o D-glucurónico) y D-glucosamina, unidos de forma  
alternada. El ácido L-idurónico puede estar 2-O-sulfatado y la D-glucosamina, puede  
estar *N*-sulfatada y/o 6-O-sulfatada, y en menor extensión *N*-acetilada o 3-O-sulfatada.  
15 La heparina se usa preferentemente como sal sódica, pero también puede usarse como  
sal de otros metales alcalinos o alcalinotérreos y se utiliza principalmente como  
medicamento antitrombótico y anticoagulante.

Las heparinas se pueden clasificar en función de su peso molecular en, heparina no  
fraccionada (HNF), heparina de bajo peso molecular (HBPM) y heparina de muy bajo  
20 peso molecular (HMBPM). Las HBPM y HMBPM provienen de la despolimerización de  
la molécula original de HNF.

En cualquier caso, para la HNF así como para las diversas HBPM ó HMBPM obtenidas  
por los métodos conocidos de despolimerización (enzimática, ácido nitroso,  $\beta$ -  
eliminación, etc.), los procedimientos actuales de purificación se realizan por  
25 precipitación selectiva de sus cadenas oligosacarídicas con alcoholes (principalmente  
metanol y etanol) y en menor medida con otros solventes como acetona. Teniendo en  
cuenta que se emplean varios volúmenes de alcohol con respecto al volumen de la  
disolución acuosa que contiene el producto de interés y que además generalmente son  
varias las purificaciones que son necesarias realizar, desde un punto de vista industrial  
30 esta estrategia de purificación plantea un problema en cuanto al volumen de residuos  
alcohólicos generados en relación a su gestión, almacenamiento y reciclaje.

Así, desde un punto de vista de gestión de residuos, son más interesantes otras  
alternativas de purificación donde no sea necesario el uso de alcohol. Dializar la solución  
acuosa que contiene el producto de interés frente a una membrana del tamaño de poro  
35 adecuado es una alternativa, pero presenta el inconveniente que hay que dializar frente

a grandes cantidades de agua y además es complicado escalar procesos optimizados de escala de laboratorio a escala industrial.

Si analizamos el estado del arte previo, observamos que hay numerosos procedimientos de obtención de enoxaparina sódica, aunque mucho más complejos que el de la

5 presente invención o con presencia de disolventes alcohólicos.

Así, en la patente CN103342761 se describe un procedimiento de preparación de enoxaparina sódica en el que se incluyen dos ultrafiltraciones en serie por membranas de 8 KDa y 2 KDa respectivamente, con el objetivo de eliminar productos de degradación e impurezas de bajo peso molecular y controlar el peso molecular y la distribución de

10 pesos moleculares del producto en presencia de disolventes alcohólicos. Una vez obtenido el producto purificado, se liofiliza para obtener enoxaparina sódica. En este caso, la liofilización se utiliza para eliminación de los disolventes y humedad que pudieran haberse quedado alojados en la estructura de la enoxaparina sódica obtenida a partir del proceso de esta patente.

15 La patente CN102050888 también describe un proceso de purificación final de enoxaparina sódica en presencia de disolventes alcohólicos con una etapa de concentración en membrana de  $\leq 1$  KDa y posterior liofilización en el que además se controla el peso molecular y la distribución de pesos moleculares del producto. Del mismo modo que la patente anterior, la liofilización se utiliza para eliminación de los  
20 disolventes y humedad que pudieran haberse quedado alojados en la estructura de la enoxaparina sódica obtenida a partir del proceso de esta patente.

Otros procesos de preparación y/o purificación de polisacáridos están descritos en el arte: ES2161615A1 de Laboratorios Farmacéuticos ROVI, S.A., US2009105194A1 de Flengsrud, US5767269 de Hirsh, WO2010/111710A1 de Solazyme, Inc.,  
25 US2007/0154492A1 de Michon, Griffin et al. ("Isolation and characterization of heparan sulfate from crude porcine intestinal mucosal peptidoglycan heparin" en Carbohydr. Res. (1995), 276, 183-197), y US5110918 de Casu. Esos procesos requieren la precipitación fraccionada de la heparina despolimerizada.

Teniendo en cuenta el estado del arte más próximo, es reseñable que todos los  
30 documentos anteriores adolecen de inconveniencia de utilizar alcoholes en unas u otras etapas del procedimiento, lo que actualmente es algo indeseable a causa de una mayor preocupación existente por el medio ambiente. Algún documento además hace uso de medios tamponados con sales durante alguna de las etapas de filtración tangencial. Sin embargo, el control de pesos moleculares mediante el tamaño de poro empleado y los  
35 parámetros indicados por los documentos del estado del arte es poco específico y no permite definir un determinado perfil estructural de la enoxaparina sódica obtenida. En

consecuencia, sería deseable proporcionar un procedimiento de obtención de HBPM simplificado y eficiente, que elimine el uso de alcoholes, que además permita un control sobre el perfil del producto obtenido de tal manera que pueda ponerse en práctica en continuo.

5

### Resumen de la invención

Como alternativa, en la presente invención se utiliza una metodología por filtración tangencial (o TFF por sus siglas en inglés) utilizando tampones de diafiltración no alcohólicos, lo que representa una ventaja significativa respecto a los procedimientos descritos en el estado del arte previo ya que además se minimiza el contenido en solventes residuales en el producto obtenido mejorando por tanto el perfil de pureza con respecto a estos. Además, el método diseñado en la presente invención proporciona un procedimiento que puede realizarse en continuo ya que permite el perfilado del producto obtenido sin necesidad de realizar ajustes estructurales. Ello hace que con respecto a los procedimientos de obtención que implican purificación por precipitaciones fraccionadas, se minimice el tiempo de producción con la consiguiente mejora en cuanto a la reducción de costes y el aumento de la capacidad de producción.

En unas realizaciones del proceso de la invención, la heparina despolimerizada cruda es producto de un proceso de despolimerización de heparina. En unas realizaciones, el proceso de la invención excluye el uso de precipitación fraccionada de la heparina despolimerizada, en particular se excluye el uso de precipitación fraccionada de la heparina despolimerizada producida por despolimerización de heparina. También, la invención provee realizaciones en la cuales la heparina de bajo peso molecular es preparada en dos etapas principales: a) despolimerización de heparina para formar heparina despolimerizada cruda; y b) purificación de la heparina despolimerizada cruda por medio de TFF (concentración y/o diafiltración usando membranas tal como están descritas a continuación) y sin uso de precipitación fraccionada.

En unas realizaciones, la heparina despolimerizada es enoxaparina sódica o bemiparina sódica; preferiblemente enoxaparina sódica.

En unas realizaciones del proceso de la invención, la enoxaparina sódica (o bemiparina sódica) cruda es producto de un proceso de despolimerización de heparina. En unas realizaciones, el proceso de la invención excluye el uso de precipitación fraccionada de la enoxaparina sódica (o bemiparina sódica), en particular se excluye el uso de precipitación fraccionada de la enoxaparina sódica (o bemiparina sódica) producida por despolimerización de heparina. También, la invención provee realizaciones en la cuales la enoxaparina sódica (o bemiparina sódica) pura es preparada en dos etapas

- principales: a) despolimerización de heparina para formar enoxaparina sódica (o bemiparina sódica) cruda sin precipitación fraccionada; y b) purificación de la enoxaparina sódica (o bemiparina sódica) cruda por medio de TFF (concentración y/o diafiltración usando membranas tal como están descritas a continuación) y sin uso de
- 5 precipitación fraccionada.

En algunas realizaciones, el peso molecular (Mw) de la enoxaparina cae dentro de los rangos siguientes.

| Muestra                                                 | Mw,<br>Da     | M1<br><2000 Da, % | M2<br>2000-8000 Da, % | M3<br>>8000 Da, % |
|---------------------------------------------------------|---------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| Enoxaparina sódica<br>cruda                             | 3000-<br>5000 | ≤25               | 60-80                 | ≤20               |
| Enoxaparina sódica<br>obtenida<br>(procedimiento nuevo) | 3800-<br>5000 | 12.0-20.0         | 68.0-82.0             | ≤18.0             |

- 10 En algunas realizaciones, el peso molecular (Mw) de la bemiparina cae dentro de los rangos siguientes.

| Muestra                                                | Mw,<br>Da     | M1<br><2000 Da, % | M2<br>2000-6000 Da, % | M3<br>>6000 Da, % |
|--------------------------------------------------------|---------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| Bemiparina sódica<br>cruda                             | 2500-<br>5000 | <40               | 50-75                 | <25               |
| Bemiparina sódica<br>obtenida<br>(procedimiento nuevo) | 3000-<br>4200 | <35.0             | 50.0-75.0             | <15.0             |

- Para controlar los parámetros que permiten la puesta en práctica del método empleado
- 15 en la presente invención, se seleccionan determinadas membranas de filtración con un tamaño de poro definido que permite su utilización sobre productos en un amplio rango de pesos moleculares. Generalmente las membranas disponibles varían entre 1 KDa y 1000 KDa (o  $\leq 1$  KDa) de corte nominal. El corte nominal o “nominal molecular weight cutoff” (NMWCO), se define como el peso molecular mínimo de un soluto que se retiene
- 20 en un 90% por la membrana y se determina evaluando la retención por la membrana de componentes de diferentes pesos moleculares (Figura 6).

En HBPM tales como la bemiparina sódica o la enoxaparina sódica, con pesos moleculares medios de 3600 y 4400 Da, respectivamente, el rango de membranas disponibles se limita por tanto a aquellas con corte nominal aproximadamente  $\leq 1$  KDa, ya que tamaños de poro superiores conllevarían la pérdida de las cadenas oligosacarídicas de más bajo peso molecular.

Los inventores de la presente invención han desarrollado un método que permite la obtención de HBPM, y en concreto de enoxaparina sódica y bemiparina sódica, mediante concentración por TFF sin necesidad de utilizar alcoholes u otros solventes orgánicos, ni medios tamponados con sales, obteniéndose un producto con un mejor perfil de pureza que aquellos métodos descritos en documentos anteriores, con atributos de calidad adecuados, de acuerdo con los parámetros descritos en la monografía de este producto según la Farmacopea Europea (última edición) y la Farmacopea de Estados Unidos (última edición). Además, el producto presenta un perfil de peso molecular medio y una distribución de cadenas oligosacarídicas idóneo para sus posibles aplicaciones farmacológicas.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) con una distribución de peso molecular medio de entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 5,0 KDa, que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una solución de heparina despolimerizada con un rango de distribución de cadenas oligosacarídicas de entre aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10 KDa y una concentración de heparina de hasta aproximadamente 4% p/v;
- b) realizar una etapa de concentración mediante filtración de flujo tangencial (TFF) en fase acuosa utilizando una membrana con corte nominal de aproximadamente  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente el 25% p/v.

Preferiblemente, la solución de la etapa a) es una disolución acuosa.

La concentración de heparina en la etapa a) es preferiblemente de entre aproximadamente 3% y aproximadamente 4% p/v, más preferiblemente de entre aproximadamente 3,5% y aproximadamente 4% p/v, incluso más preferiblemente de aproximadamente 4% p/v.

Preferiblemente, la membrana utilizada para la concentración mediante filtración de flujo tangencial presenta un corte nominal de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1 KDa; más preferiblemente de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1 KDa. En una realización particular, presenta un corte nominal de aproximadamente 1 KDa.

La filtración de flujo tangencial (TFF), así como el resto de etapas del método de la invención (clarificación, filtración de profundidad, diafiltración, tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), pueden llevarse a cabo en fase acuosa sin alcohol ni otros disolventes orgánicos.

La etapa b) puede incluir al menos una etapa de concentración mediante filtración de flujo tangencial (TFF) en fase acuosa utilizando una membrana de aproximadamente ≤1 KDa de corte nominal, por ejemplo 1, 2 o 3, hasta conseguir una concentración máxima de la heparina de aproximadamente 25% p/v.

En la etapa b) la concentración de la heparina conseguida puede ser de al menos 5% p/v, preferiblemente al menos 8% p/v. Preferiblemente, en la etapa b) se consigue una concentración de la heparina de al menos 10% p/v, preferiblemente entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25% p/v; más preferiblemente entre aproximadamente 10% y aproximadamente 22% p/v; incluso más preferiblemente entre aproximadamente 10% y aproximadamente 20%. En una realización particular, en la etapa b) se consigue una concentración de la heparina de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 22% p/v.

En una realización, en la etapa b) se realiza una única etapa de concentración mediante TFF. En una realización particular, en la etapa b) se realiza una única etapa de concentración mediante TFF hasta conseguir una concentración de la heparina de al menos 10% p/v, preferiblemente de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 22% p/v, más preferiblemente de entre aproximadamente 12% y aproximadamente 22% p/v.

De acuerdo con otra realización de la invención, en la etapa b) se realiza una única etapa de concentración mediante TFF hasta conseguir una concentración de la heparina de al menos un 5% p/v; preferiblemente al menos un 10% p/v, más preferiblemente entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 15% p/v o entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 22%.

En una realización adicional, el procedimiento de la invención comprende:

a) proporcionar una solución de heparina despolimerizada con un rango de distribución de cadenas oligosacáridicas de entre 0,6 a 10 KDa y una concentración de heparina de entre aproximadamente 3% y aproximadamente 4% p/v, preferiblemente aproximadamente 4% p/v;

b) realizar una única etapa de concentración mediante filtración de flujo tangencial (TFF) en fase acuosa utilizando una membrana de aproximadamente ≤1 KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, preferiblemente entre aproximadamente 12% y aproximadamente 22% p/v.

En otra realización, la etapa b) incluye dos etapas de concentración mediante TFF.

En una realización preferida, en la etapa (b) se realiza una primera concentración mediante TFF hasta conseguir una concentración de la heparina de entre aproximadamente 4% y aproximadamente 10% p/v, preferiblemente entre  
5 aproximadamente 5% y aproximadamente 10% p/v, y una segunda etapa de concentración mediante TFF hasta conseguir una concentración de la heparina de entre aproximadamente 10% a aproximadamente 25% p/v. En una realización más preferida, con la segunda etapa de concentración se consigue una concentración de la heparina de entre aproximadamente 12% y aproximadamente 25%, más preferiblemente entre  
10 aproximadamente 12% y aproximadamente 22% p/v.

En otra realización preferida se realiza una concentración mediante TFF, en una única etapa, desde aproximadamente el 4% p/v hasta aproximadamente el 12-22% p/v (o aproximadamente 10-25% p/v).

El procedimiento de la invención puede incluir una o varias etapas adicionales tal como  
15 clarificación, filtración de profundidad, diafiltración con agua, tratamiento con peróxido de hidrógeno o liofilización.

En otra realización preferida, se realiza al menos una etapa de clarificación de la solución de heparina de la etapa (a).

En otra realización preferida, se realiza al menos una etapa de filtración de profundidad  
20 que puede ser previa o posterior a cualquiera de las etapas de concentración de TFF. Por ejemplo, previa o posterior a la etapa de concentración de TFF (si sólo se realiza una) o a la primera etapa de concentración de TFF en caso de que la etapa b) comprenda más de una etapa de concentración de TFF en caso de que la etapa b) comprenda más de una etapa de concentración de TFF.

25 En otra realización preferida, se realiza al menos una etapa de diafiltración con agua que puede ser previa o posteriormente a cualquiera de las etapas de concentración de TFF. Por ejemplo, previa o posterior a la etapa de concentración de TFF o a la primera etapa de concentración de TFF en caso de que la etapa b) comprenda más de una etapa de concentración de TFF en caso de que la etapa b) comprenda más de una etapa de  
30 concentración de TFF.

En una realización preferida, se realiza una etapa de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que puede ser previa a la etapa de concentración de TFF o previa a cualquiera de las etapas de concentración en caso de que la etapa b) comprenda más de una etapa de concentración de TFF. Por ejemplo, en caso de que la etapa b) comprenda dos etapas  
35 de concentración de TFF, se puede realizar una etapa de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> previa a la primera etapa de concentración o previa a la segunda etapa de concentración.

En otra realización preferida, se realiza al menos una etapa de diafiltración con agua que puede ser previa a la etapa de concentración de TFF o a la etapa de concentración de TFF o a la primera etapa de concentración mediante TFF (en caso de que la etapa b) comprenda más de una etapa de concentración de TFF) o previa a la etapa de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anteriormente mencionada.

En otra realización preferida, se realiza una etapa de liofilización del concentrado obtenido en la etapa (b).

En la presente invención, se entiende como "HBPM" a las heparinas con un peso molecular medio menor de aproximadamente 8000 Da. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos del procedimiento de la invención es eliminar impurezas asociados al proceso de fabricación, que generalmente son de bajo peso molecular (< 500 Da), las membranas disponibles para su uso son limitadas ya que lo ideal es que presenten un corte menor del peso molecular medio de la HBPM de modo que permita eliminar impurezas de bajo peso molecular sin pérdida de cadenas oligosacáridicas. Preferiblemente, el corte nominal de las membranas empleadas es de ≤1 KDa, aunque éste puede variarse en función de los pesos moleculares que interese obtener.

Como el experto en la materia conoce, entre las distintas etapas de concentración por TFF se llevan a cabo preferiblemente las etapas de mantenimiento que puedan ser requeridas para la limpieza y/o regeneración de las membranas, utilizando para ello agua, NaOH o cualquier otro producto de acuerdo con las especificaciones de las mismas.

La especificación describe una o más realizaciones que incorporan características de esta invención. El alcance de la presente invención no se limita únicamente a las realizaciones descritas. La invención incluye todas las combinaciones y subcombinaciones de los diversos aspectos y realizaciones descritos en este documento. Estos y otros aspectos de esta invención serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada, ejemplos, reivindicaciones y figuras adjuntas.

#### **Breve descripción de los dibujos**

Las figuras adjuntas, que se incorporan aquí y forman parte de la especificación, ilustran una o más realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven además para explicar los principios de la presente invención y para permitir a una persona experto en la técnica pertinente hacer y usar la invención. Los siguientes dibujos se proporcionan solo a modo de ilustración, y por lo tanto no pretenden limitar el alcance completo de la presente invención.

**Figura 1:** Esquema comparativo entre la filtración de flujo normal y la filtración de flujo tangencial.

**Figura 2:** Esquema general del procedimiento de filtración tangencial.

**Figura 3:** Comparación de los procesos de concentración y diafiltración

5 **Figuras 4A y 4B:** Esquemas del procedimiento de purificación de acuerdo con la invención.

**Figuras 5A-5D:** Comprende diversos gráficos que representan que la variación tanto en peso molecular medio (FIG. 5A) como en la distribución de pesos moleculares (FIG. 5B: <2000 KDa; FIG. 5C: >8000KDa; FIG. 5D: 2000-8000 KDa) es lineal durante la segunda  
10 concentración desde el 10% hasta el 20% de concentración nominal del producto en el retenido.

**Figura 6:** Corte nominal: definición.

### Descripción de la invención

15 En la presente invención se entiende como “filtración de flujo tangencial” o “TFF” a la técnica de filtración en la que la solución a filtrar pasa tangencialmente sobre la superficie del filtro, de modo que la diferencia de presión que se genera permite que los componentes que son más pequeños que el tamaño de poro pasen a través de ellos (permeado). Los componentes con un tamaño mayor se retienen pasando sobre la superficie del filtro y  
20 vuelven al tanque de alimentación (retenido).

En la presente invención se entiende como “clarificación”, la filtración que se realiza para eliminar las partículas en suspensión presentes en la disolución, tal como la filtración llevada a cabo con filtros de entre 1-60 micras, preferiblemente de entre 1-25 micras.

En la presente invención se entiende como “filtración de profundidad”, como aquella  
25 filtración en la que se usa un medio filtrante con múltiples pasos en forma de laberinto, que ayuda a retener las partículas. Las de mayor tamaño quedarán retenidas en la superficie y las más finas siguen su camino hacia el interior del medio filtrante quedando atrapadas en las capas internas, de modo que se consigue disminuir la turbidez de la disolución. En una realización particular, es una filtración llevada a cabo con filtros de entre 1-5 micras,  
30 preferiblemente de entre 2-4 micras. La filtración se puede llegar a cabo con uso de agua o solución tamponada.

En la presente invención se entiende como “concentración”, la etapa de filtración tangencial en la que el producto retenido va aumentando su concentración en la disolución al irse eliminando permeado (ver Figura 3).

35 En la presente invención se entiende como “diafiltración”, la etapa de filtración tangencial en la que a la vez que se va eliminando el permeado, la disolución se va alimentando con

el mismo caudal de agua o solución tamponada (buffer), de modo que no se modifica la concentración del retenido en la disolución (ver Figura 3). En este caso se puede emplear una membrana como en la concentración mediante TFF, es decir una membrana de aproximadamente  $\leq 1$  KDa de corte nominal, preferiblemente de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1 KDa, más preferiblemente de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1 KDa, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1 KDa.

En una realización, la heparina (después de despolimerización) es una sal sódica de heparina, p.ej. enoxaparina sódica o bemiparina sódica.

La enoxaparina sódica cruda puede obtenerse mediante despolimerización alcalina (e.g.

NaOH) del éster bencílico de heparina obtenida de la mucosa intestinal porcina.

En una realización particular, el producto obtenido tras la despolimerización de la enoxaparina sódica corresponde a una disolución que, además de contener enoxaparina sódica cruda, contiene impurezas correspondientes a la saponificación en medio alcalino del éster bencílico de heparina, además de sales correspondientes a los

ajustes de pH realizados durante el proceso de rotura. Según una realización de la invención, el proceso de TFF se realiza sobre esta solución de enoxaparina sódica cruda, de modo que se lleva a cabo la concentración de esta solución con el objetivo, por un lado, de eliminar las impurezas de bajo peso molecular, y por otro, de alcanzar la concentración adecuada para llevar a cabo el tratamiento decolorante con peróxido de hidrógeno. Alternativamente, el tratamiento decolorante con  $H_2O_2$  podría llevarse a cabo antes de la etapa de concentración mediante TFF. Estas etapas se pueden lograr sin uso de precipitación fraccionada del producto crudo (la heparina despolimerizada cruda).

Alternativamente, el tratamiento decolorante con  $H_2O_2$  podría llevarse a cabo antes de la etapa de concentración mediante TFF.

Adicionalmente, es posible llevar a cabo un proceso de diafiltración (opcional) para una eliminación exhaustiva de impurezas de bajo peso molecular, anterior o posterior a la etapa de concentración. Una vez finalizada esta etapa, opcionalmente, se realiza una segunda concentración con objeto de eliminar las impurezas salinas generadas y ajustar el contenido en cadenas oligosacáridicas de bajo peso molecular, para lo que se realiza seguimiento del peso molecular medio de la disolución; una vez alcanzado el valor óptimo se liofiliza para obtener enoxaparina sódica de la pureza adecuada.

Por lo tanto, en una realización particular el procedimiento de la invención comprende:

- a) proporcionar una solución de enoxaparina sódica despolimerizada con un rango de distribución de cadenas oligosacáridicas de entre aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10 KDa y una concentración de enoxaparina sódica de hasta

aproximadamente 4% p/v;

- 5 b) realizar una etapa de concentración mediante TFF en fase acuosa utilizando una membrana de  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, de hasta aproximadamente 10% p/v, o preferiblemente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10% p/v;
- c) opcionalmente, realizar una etapa de diafiltración con agua (p.ej. agua no tamponada) antes o después de la etapa b),
- d) realizar una etapa de tratamiento con  $H_2O_2$  antes o después de la etapa b),
- 10 e) opcionalmente, realizar una segunda etapa de concentración mediante TFF en fase acuosa utilizando una membrana de  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, preferiblemente entre aproximadamente 12% y aproximadamente 25% p/v, y
- f) realizar una etapa de liofilización del producto obtenido.

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende:

- 15 a) proporcionar una solución de enoxaparina sódica despolimerizada con un rango de distribución de cadenas oligosacáridicas de entre aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10 KDa y una concentración de enoxaparina sódica de hasta el 4% p/v;
- b) realizar una etapa de concentración mediante TFF en fase acuosa utilizando una
- 20 membrana de  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, de hasta aproximadamente 10% p/v, o preferiblemente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10% p/v;
- c) realizar una etapa de tratamiento con  $H_2O_2$  del producto obtenido en la etapa b),
- d) realizar una segunda etapa de concentración mediante TFF en fase acuosa
- 25 utilizando una membrana de  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, preferiblemente entre aproximadamente 12% y aproximadamente 25% p/v; y
- e) realizar una etapa de liofilización del producto obtenido.

Preferiblemente, el procedimiento de esta realización incluye una etapa de

30 clarificación y/o de filtración de profundidad antes de la etapa b).

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende:

- a) proporcionar una solución de enoxaparina sódica despolimerizada con un rango de distribución de cadenas oligosacáridicas de entre aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10 KDa y una concentración de enoxaparina sódica de hasta
- 35 el 4% p/v;

- b) realizar una etapa de concentración mediante TFF en fase acuosa utilizando una membrana de  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, de hasta aproximadamente 10% p/v, o preferiblemente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10% p/v;
- 5 c) realizar una etapa de diafiltración con agua del producto obtenido en la etapa b),
- d) realizar una etapa de tratamiento con  $H_2O_2$  del producto obtenido en la etapa c),
- e) opcionalmente, realizar una etapa de filtración de profundidad del producto obtenido en la etapa d),
- 10 f) realizar una segunda etapa de concentración mediante TFF en fase acuosa utilizando una membrana de  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, preferiblemente entre aproximadamente 12% y aproximadamente 25% p/v; y
- g) realizar una etapa de liofilización del producto obtenido.

Preferiblemente, el procedimiento de esta realización incluye una etapa de clarificación y/o de filtración de profundidad antes de la etapa b).

15

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende:

- a) proporcionar una solución de enoxaparina sódica despolimerizada con un rango de distribución de cadenas oligosacáridicas de entre aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10 KDa y una concentración de enoxaparina sódica de hasta aproximadamente 4% p/v;
- 20 b) realizar una etapa de concentración mediante TFF en fase acuosa utilizando una membrana de  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta el 25% p/v, preferiblemente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10% p/v;
- 25 c) realizar una etapa de filtración en profundidad del producto obtenido en la etapa b),
- d) realizar una etapa de tratamiento con  $H_2O_2$  del producto obtenido en la etapa c),
- e) realizar una segunda etapa de concentración mediante TFF en fase acuosa utilizando una membrana de  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, preferiblemente entre aproximadamente 12% y aproximadamente 25% p/v; y
- 30 f) realizar una etapa de liofilización del producto obtenido.

Preferiblemente, el procedimiento de esta realización incluye una etapa de clarificación y/o de filtración de profundidad antes de la etapa b).

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende:

- a) proporcionar una solución de enoxaparina sódica despolimerizada con un rango de distribución de cadenas oligosacáridicas de entre 0,6 a 10 KDa y una concentración de enoxaparina sódica de hasta aproximadamente 4% p/v;
- 5 b) realizar una etapa de diafiltración con agua de la solución de la etapa a),
- c) realizar una etapa de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del producto obtenido en la etapa c),
- d) realizar una etapa de concentración mediante TFF en fase acuosa utilizando una membrana de ≤1 KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, preferiblemente entre
- 10 aproximadamente 5% y aproximadamente 20% p/v; y
- e) realizar una etapa de liofilización del producto obtenido.

Preferiblemente, el procedimiento de esta realización incluye una etapa de clarificación y/o de filtración de profundidad antes de la etapa b).

### Ejemplos de la invención

- 15 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan a continuación sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. La enoxaparina sódica cruda y la bemiparina sódica cruda fueron preparadas a través la despolimerización de heparina sin uso de precipitación
- 20 fraccionada.

A continuación, se detalla el proceso de obtención de la enoxaparina sódica cruda, producto de partida utilizado en los ejemplos 1, 2, 3, 4 y 5 descritos. Se disuelven 10 g de heparina sódica en agua purificada y bajo agitación se añade cloruro de bencetonio, formándose el heparinato de bencetonio. El producto formado se lava varias veces con

25 agua para eliminar el exceso de cloruros y finalmente el producto se seca por liofilización. El heparinato de bencetonio se disuelve en cloruro de metileno y se ajusta la temperatura. Se añade cloruro de bencilo y se deja reaccionar. El producto obtenido es éster bencílico de heparina. El éster bencílico de heparina se disuelve en agua y se añade hidróxido de sodio. Una vez finalizada la reacción se neutraliza la solución y el

30 producto formado es enoxaparina sódica cruda. Una vez obtenida la enoxaparina sódica cruda, se procede a la realización de los ejemplos descritos a continuación.

### Ejemplo 1

Se realizó el procedimiento de la invención siguiendo las siguientes etapas principales:

- a) primera concentración por TFF para obtener un producto con una concentración de heparina de 4% a 10% p/v;
- b) diafiltración y tratamiento con  $H_2O_2$ ;
- c) segunda concentración por TFF para obtener un producto final con una concentración de heparina de 10% al 20% p/v.

Inicialmente, se utilizó como producto de partida enoxaparina sódica cruda con una concentración de producto de 40 g/L y una distribución de cadenas oligosacáridicas entre 0,6 y 10 KDa. Este producto inicial se prefiltró con un filtro Clarigard® de 3,0  $\mu m$ . La enoxaparina sódica cruda es producto del proceso de despolimerización de heparina.

A continuación, se llevó a cabo la primera etapa de concentración mediante TFF, destinada a incrementar la concentración de enoxaparina hasta un valor entre el 4% y el 10%, así como para reducir la concentración de contaminantes (principalmente sales con un peso molecular  $< 0,5$  KDa y otros pequeños productos resultantes de procedimientos de fabricación previos). Para ello, se utilizó una membrana de celulosa regenerada Millipore® de  $\leq 1$  KDa de corte nominal. La etapa de concentración se inició con aproximadamente 2005 g de producto con una presión transmembrana (TMP) de 3,25 bar previamente a pasar el flujo de permeado a un contenedor separado, el sistema se mantuvo en recirculación total durante unos 15 minutos.

Durante la concentración, el flujo de permeado varió de 9 inicial a 4,8 LMH ( $L/m^2/h$ ) final (53% del flujo inicial), para un flujo promedio de 6,2 LMH. Se recogieron 2 x muestras de permeado, una en VCF (factor de concentración de volumen) = 1,26X (P1) y la otra del volumen de permeado al final de la concentración (P2). También se tomó una muestra del volumen del material retenido al final de la concentración (R1), así como una muestra de la alimentación inicial, después de la prefiltración por el filtro de 3,0  $\mu m$  (B1). Los datos principales del estudio de concentración se presentan en la Tabla 1.

| Tabla 1: Estudio de concentración de HBPM (4 $\rightarrow$ 10%) |                       |         |                                |                            |              |                        |                        |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|---------|--------------------------------|----------------------------|--------------|------------------------|------------------------|
| Volumen Inicial (L)                                             | Volumen extraíble (L) | VCF (X) | Flujo medio de permeado (HBPM) | Tª (°C)                    | Tiempo (min) | $\Delta$ Presión (bar) | Flujo Tangencial (LMM) |
| 2.005                                                           | 1,2                   | 2,49    | 6,2                            | 23,6<br>$\rightarrow$ 25,7 | 106          | 0,5 $\rightarrow$ 0,7  | 5,3                    |

- Posteriormente, se llevó a cabo una etapa de diafiltración utilizando agua purificada, destinada a clarificar el producto resultante. Durante la diafiltración, el flujo de permeado disminuyó continuamente de un 8,4 inicial a un 2,4 LMH final (aprox. 29%), para un flujo promedio de 5,03 LMH. Se recogieron 3 x muestras de permeado, cada una al finalizar
- 5 cada diavolumen (D1, D2 y D3 respectivamente) y otro a partir del volumen del material retenido al final de la diafiltración (D5). En la Tabla 2 se pueden apreciar las condiciones con las que se llevó a cabo el estudio de diafiltración:

| Tabla 2: Estudio de diafiltración de HBPM |                    |                             |                                |                     |              |                |                        |
|-------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------|----------------|------------------------|
| Vol. Inicial (L)                          | Vol. extraíble (L) | Volúmenes diafiltración (N) | Flujo medio de permeado (HBPM) | T <sup>a</sup> (°C) | Tiempo (min) | ΔPresión (bar) | Flujo Tangencial (LMM) |
| 0,798                                     | 2,3                | 3                           | 5,03                           | 26,5<br>→27,8       | 390          | 0,3 → 0,8      | 5,3                    |

- 10 Los aproximadamente 0,8 L de producto obtenido tras la diafiltración se sometieron posteriormente a reacción química con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Antes de continuar con la segunda etapa de concentración mediante TFF, se llevó a cabo una etapa adicional (opcional) de clarificación, utilizando para ello nuevamente un filtro Clarigard® de 3,0 µm, destinado a retirar las eventuales partículas que hayan
- 15 podido decantar al fondo del recipiente.
- A continuación, se llevó a cabo una segunda etapa de concentración mediante TFF, destinada en esta ocasión a alcanzar una concentración de enoxaparina de entre el 10% y el 20% p/v, utilizando igualmente una membrana de celulosa regenerada Millipore® de ≤1 KDa de corte nominal.
- 20 Durante la concentración, el flujo de permeado varió de 3 inicial a 0,75 LMH final (25%), para un flujo promedio de 1,5 LMH. Se recogieron 2 x muestras de permeado, una en VCF = 1,34X (P3) y la otra en el volumen de permeado al final de la concentración (P4). También se tomó una muestra del volumen del material retenido tras la concentración (R2), después de haber despolarizado la membrana dejando el sistema funcionando a
- 25 una TMP baja (1,2 bar) por 10 minutos.
- En la siguiente Tabla 3 se muestran los pesos moleculares de las muestras tomadas durante el proceso anteriormente descrito, analizadas según el método establecido por la farmacopea europea (EP).

| Tabla 3: Pesos moleculares de las muestras obtenidas en las diferentes etapas del proceso |        |             |                 |             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------|-----------------|-------------|
| Muestra                                                                                   | Mw, Da | <2000 Da, % | 2000-8000 Da, % | >8000 Da, % |
| Enoxaparina sódica cruda                                                                  | 3737   | 23,8        | 71,1            | 8,1         |
| B1 (clarificación por Clarigard®)                                                         | 3723   | 24,0        | 71,1            | 5,0         |
| P1 (1º muestra permeado, 1ª concentración)                                                | < 600  | ---         | ---             | ---         |
| P2 (2ª muestra permeado, 1ª concentración)                                                | < 600  | ---         | ---             | ---         |
| R1 (retenido tras primera concentración)                                                  | 3645   | 25,2        | 69,9            | 4,8         |
| D1 (permeado tras primer diavolumen)                                                      | 1196   | 96,5        | 3,5             | 0,0         |
| D2 (permeado tras segundo diavolumen)                                                     | 1491   | 84,5        | 15,5            | 0,0         |
| D3 (permeado tras tercer diavolumen)                                                      | 1646   | 78,1        | 21,9            | 7,0         |
| D5 (retenido tras finalizar diafiltración)                                                | 4158   | 14,6        | 78,4            | 7,0         |
| P3 (1º muestra permeado, 2ª concentración)                                                | 1866   | 67,3        | 32,7            | 0,0         |
| P4 (2º muestra permeado, 2ª concentración)                                                | 1991   | 60,3        | 39,7            | 0,0         |
| R2 (retenido tras segunda concentración)                                                  | 4444   | 8,1         | 84,0            | 7,9         |

Como se muestra en los porcentajes de las fracciones de MW del producto objetivo (menos de 2000 Da, 2000 a 8000 Da y más de 8000 Da) en la tabla anterior, parece que la primera etapa de concentración no afecta negativamente al perfil del producto (no hay pérdida de ninguna fracción en el permeado según se ve en las muestras P1 y P2).

Respecto a las muestras tomadas durante la diafiltración, D1, D2, D3 y D5, indican que:

- básicamente no hay pérdida de la fracción más alta de MW en el permeado, a lo largo de la diafiltración;
- hay una cierta pérdida de las fracciones de MW más pequeñas y medias en el permeado, la pérdida más alta es siempre relativa a la fracción más baja;
- la tasa de pérdida de las fracciones más pequeñas y medias disminuyen, respectivamente, a lo largo de la diafiltración;

– en general, hay una cierta reducción y enriquecimiento a lo largo de la diafiltración de fracciones más pequeñas y de fracciones media-altas respectivamente (de acuerdo con el corte de la membrana de  $\leq 1$  KDa).

Los números relativos a las muestras instantáneas de permeado P3, P4 y la muestra

5 R2 del final de la segunda etapa de concentración, indican que:

- básicamente no hay pérdida de la fracción más alta de MW en el permeado, a lo largo de esta etapa;
- hay una cierta pérdida de las fracciones de MW más pequeñas y medias en el permeado, la pérdida más alta siempre es relativa a la fracción más pequeña (como en la diafiltración);
- 10 – la tasa de pérdida de la fracción media aumenta en esta segunda etapa de concentración (como en la diafiltración).

### Ejemplo 2

Se realizó el procedimiento de la invención siguiendo las siguientes etapas principales:

- 15 a) Primera concentración por TFF para obtener un producto con una concentración de heparina desde 4% a 10% p/v;
- b) Tratamiento con  $H_2O_2$ ;
- c) Segunda concentración por TFF para obtener un producto final con una concentración de heparina desde el 10% al 20% p/v.

20 Aproximadamente 1936 g de producto de partida se transfirieron al tanque y el sistema se operó en recirculación total a un TMP = 3,2 bar durante 10 minutos a un flujo cruzado de 5,1 LMM.

Durante la concentración, el flujo de permeado varió desde un 9,6 inicial hasta un 4,2 LMH final (44%), para un flujo promedio de 6 LMH. Se recolectó una muestra de permeado instantáneo en VCF = 1,43X (P5), otra del permeado tras finalizar la concentración (P6) y finalmente del retenido (R3) al final de la concentración, después de dejar el filtro en total recirculación a TMP = 0,6 bar para 10' (despolarización de membrana). También se tomó una muestra de la disolución de partida (B2), antes de su transferencia al tanque.

30 Se transfirieron aproximadamente 794 g de producto al tanque tras haber sido tratados con  $H_2O_2$  y se procedió con la segunda etapa de concentración.

Durante la concentración, el flujo de permeado varió de 5,7 inicial a 0,9 LMH final (16,0%), para un flujo promedio de 2,5 LMH. 1 x muestra de permeado instantáneo fue recolectada en VCF = 1,33X (P7) y otra del volumen de permeado al final de la

concentración (P8). También se recolectó una muestra del volumen de retenido al final de la concentración (R4), después de haber despolarizado la membrana dejando el sistema funcionando a una TMP baja (0,8 bar) durante 10 minutos.

| Tabla 4: Toma de pesos moleculares de las etapas del proceso |        |             |                 |             |
|--------------------------------------------------------------|--------|-------------|-----------------|-------------|
| Muestra                                                      | Mw, Da | <2000 Da, % | 2000-8000 Da, % | >8000 Da, % |
| Enoxaparina sódica cruda                                     | 3646   | 24,9        | 70,6            | 4,5         |
| B2 (clarificación por Clarigard®)                            | 3742   | 23,5        | 71,5            | 4,9         |
| P5 (1º muestra permeado, 1ª concentración)                   | < 600  | ---         | ---             | ---         |
| P6 (2ª muestra permeado, 1ª concentración)                   | < 600  | ---         | ---             | ---         |
| R3 (retenido tras primera concentración)                     | 3784   | 23,1        | 71,5            | 5,4         |
| P7 (1º muestra permeado, 2ª concentración)                   | 1311   | 90,8        | 9,2             | 0,0         |
| P8 (2º muestra permeado, 2ª concentración)                   | 1476   | 84,4        | 15,6            | 0,0         |
| R4 (retenido tras segunda concentración)                     | 4308   | 13,0        | 79,2            | 7,8         |

5

En la Tabla 4 se muestran los pesos moleculares de las muestras tomadas durante el proceso anteriormente descrito, analizadas según el método establecido por la farmacopea europea (EP).

Como lo muestran los números en la tabla anterior, parece que la primera etapa de concentración no afecta negativamente el perfil del producto (sin pérdida de ninguna fracción en el permeado, muestras P5 y P6, como en muestras P1 y P2).

Los números relativos a las muestras de permeado P7, P8 y la muestra del volumen de retenido R4 al final de la segunda etapa de concentración indican que:

- no hay pérdida de la fracción más alta de MW en el permeado, a lo largo de dicha etapa;
- hay una cierta pérdida de las fracciones de MW más pequeñas y medias en el permeado, la pérdida más alta siempre es relativa a la fracción más pequeña (como en el primer ensayo con diafiltración);

15

- la tasa de pérdida de la fracción media aumenta en la segunda concentración (como en el proceso con diafiltración).

Finalmente, la solución de retenido se liofiliza para obtener enoxaparina sódica seca.

### Ejemplo 3

- 5 Se realizó el procedimiento de la invención siguiendo las siguientes etapas principales:
- a) Primera concentración por TFF para obtener un producto con una concentración de heparina desde 4% a 10% p/v;
  - b) Filtración en profundidad;
  - c) Tratamiento con  $H_2O_2$ ;
  - 10 d) Segunda concentración por TFF para obtener un producto final con una concentración de heparina desde el 10% al 20% p/v.

Aproximadamente 2000 g de producto de partida (turbidez > 1000 NTU) se transfirieron al tanque y el sistema se operó en recirculación total a un TMP = 3,2 bar durante 15 minutos a un flujo cruzado de 5,2 LMM.

- 15 Durante la concentración, el flujo de permeado varió desde un 9,6 inicial hasta un 3,9 LMH final (41% del flujo inicial), para un flujo promedio de 5,8 LMH. Se recolectó una muestra de permeado en VCF = 1,43X (P1') y otra al final de la concentración (P2'), así como del retenido (R1') al final de la concentración después de dejar el filtro en total recirculación a TMP = 0,7 bar para 15' (despolarización de membrana). También se
- 20 tomó una muestra de la alimentación inicial (B1'), antes de su transferencia al tanque. La solución R1' se pasó por un filtro de profundidad Millistak +® HC Pro C0SP, reduciéndose la turbidez hasta 0,57 NTU, para ser posteriormente tratada con  $H_2O_2$ . Se transfirieron aproximadamente 0,8 litros de producto al tanque tras haber sido tratados con  $H_2O_2$  y se procedió con la segunda etapa de concentración.
- 25 Esta segunda concentración se realizó tomando alícuotas de forma secuencial tanto del retenido como del permeado, desde la concentración nominal inicial del 10% (muestras R'3 y P'3, respectivamente) hasta la concentración nominal final del 20% (muestras R'12 y P'12, respectivamente), pasando por las concentraciones intermedias de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19%.
- 30 En la siguiente Tabla 5 se muestran los pesos moleculares de las muestras tomadas durante el proceso anteriormente descrito, analizadas según el método establecido por la farmacopea europea (EP).

| Tabla 5: Toma de pesos moleculares de las etapas del proceso |           |                |                    |                |
|--------------------------------------------------------------|-----------|----------------|--------------------|----------------|
| Muestra                                                      | Mw,<br>Da | <2000<br>Da, % | 2000-8000<br>Da, % | >8000<br>Da, % |
| B1' (clarificación por Clarigard®)                           | 3464      | 29,6           | 65,95              | 4,50           |
| P1' (1º muestra permeado, 1ª conc.)                          | < 600     | ---            | ---                | ---            |
| P2' (2ª muestra permeado, 1ª conc.)                          | < 600     | ---            | ---                | ---            |
| R1' (retenido tras primera concentración)                    | 3416      | 31,90          | 63,37              | 4,70           |
| P3' (1º muestra permeado 11%, 2ª conc.)                      | 1054      | 100,00         | 0,00               | 0,00           |
| P4' (1º muestra permeado 12%, 2ª conc.)                      | 945       | 99,20          | 0,77               | 0,00           |
| P5' (1º muestra permeado 13%, 2ª conc.)                      | 999       | 98,40          | 1,59               | 0,00           |
| P6' (1º muestra permeado 14%, 2ª conc.)                      | 1060      | 96,90          | 3,10               | 0,00           |
| P7' (1º muestra permeado 15%, 2ª conc.)                      | 1139      | 94,20          | 5,76               | 0,00           |
| P8' (1º muestra permeado 16%, 2ª conc.)                      | 1197      | 92,20          | 7,82               | 0,00           |
| P9' (1º muestra permeado 17%, 2ª conc.)                      | 1255      | 90,00          | 10,04              | 0,00           |
| P10' (1º muestra permeado 18%, 2ª conc.)                     | 1288      | 88,70          | 11,29              | 0,00           |
| P11' (1º muestra permeado 19%, 2ª conc.)                     | 1378      | 85,40          | 14,63              | 0,00           |
| P12' (1º muestra permeado 20%, 2ª conc.)                     | 1330      | 87,20          | 12,84              | 0,00           |
| R3' (1º muestra retenido 11%, 2ª conc.)                      | 3744      | 24,6           | 69,9               | 5,6            |
| R4' (1º muestra retenido 12%, 2ª conc.)                      | 3757      | 24,3           | 70,0               | 5,7            |
| R5' (1º muestra retenido 13%, 2ª conc.)                      | 3795      | 23,5           | 70,8               | 5,8            |
| R6' (1º muestra retenido 14%, 2ª conc.)                      | 3827      | 22,6           | 71,6               | 5,9            |
| R7' (1º muestra retenido 15%, 2ª conc.)                      | 3881      | 21,5           | 72,4               | 6,1            |
| R8' (1º muestra retenido 16%, 2ª conc.)                      | 3937      | 20,2           | 73,5               | 6,3            |
| R9' (1º muestra retenido 17%, 2ª conc.)                      | 3994      | 18,9           | 74,7               | 6,4            |

| Tabla 5: Toma de pesos moleculares de las etapas del proceso |           |                |                    |                |
|--------------------------------------------------------------|-----------|----------------|--------------------|----------------|
| Muestra                                                      | Mw,<br>Da | <2000<br>Da, % | 2000-8000<br>Da, % | >8000<br>Da, % |
| R10' (1º muestra retenido 18%, 2ª conc.)                     | 4005      | 18,4           | 75,1               | 6,4            |
| R11' (1º muestra retenido 19%, 2ª conc.)                     | 4079      | 16,7           | 76,6               | 6,7            |
| R12' (1º muestra retenido 20%, 2ª conc.)                     | 4116      | 15,9           | 77,3               | 6,8            |

- La variación tanto en peso molecular medio como en la distribución de pesos moleculares es lineal durante la 2ª concentración desde el 10% hasta el 20% de concentración nominal del producto en el retenido, de modo que, ajustando el valor final de la concentración del producto en la solución del retenido, es posible definir un determinado perfil de pesos moleculares y distribución de cadenas oligosacáridicas para la obtención de enoxaparina sódica. Este hecho se puede observar en la Figura 5. Finalmente, la solución de retenido se liofiliza para obtener enoxaparina sódica seca.

#### Ejemplo 4

- 10 El producto obtenido en el ejemplo anterior se analiza para determinación de sus actividades anti-FXa y anti-FIIa. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

| Actividad anti-FXa, UI/mg<br>sss | Actividad anti-FIIa, UI/ mg<br>sss | Ratio aFXa/a FIIa |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| 112                              | 29,5                               | 3,8               |

Este atributo de calidad cumple adecuadamente con los rangos definidos tanto por la Farmacopea Europea como por la de Estados Unidos para enoxaparina sódica:

- 15
- Actividad anti-FXa: 90 – 125 UI/mg sss
  - Actividad anti-FIIa: 20,0 – 35,0 UI/mg sss
  - Ratio aFXa/aFIIa: 3,3 – 5,3

#### Ejemplo 5

- 20 Se realizó el procedimiento de la invención siguiendo las siguientes etapas principales:
- a) Diafiltración;
  - b) Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; y

c) Concentración por TFF para obtener un producto final con una concentración de heparina desde el 4% al 15% p/v.

Aproximadamente 3010 g de producto de partida se transfirieron al tanque y el sistema se operó en recirculación total a un TMP = 4,9 bar durante 15 minutos a un flujo cruzado de 2,0 LMM.

Durante la diafiltración, el flujo de permeado varió desde un 17,7 inicial hasta un 13,1 LMH final, con un flujo promedio de 12,6 LMH, y para 6 diavolúmenes. Tras cada volumen diafiltrado se recolectaron muestras tanto del permeado (DP1 a DP6) como del retenido (DR1 a DR6). El permeado se trata con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y aproximadamente 2720 g de producto tratado se transfieren al tanque.

Durante la concentración, el flujo de permeado varió de 12,7 inicial a 1,28 LMH final (89,9% de reducción), para un flujo promedio de 5,1 LMH. La concentración se realizó desde el 4 al 15%, recogiendo tanto una muestra de permeado (CP1 a CP6) como de retenido (CR1 a CR6) a partir del 10%. 1 x muestra de permeado instantáneo fue recolectada en VCF = 1,33X (P7) y otra del volumen de permeado al final de la concentración (P8). También se recolectó una muestra del volumen de retenido al final de la concentración (R4), después de haber despolarizado la membrana dejando el sistema funcionando a una TMP baja (0,8 bar) durante 10 minutos.

En la siguiente Tabla 6 se muestran los pesos moleculares de las muestras tomadas durante el proceso anteriormente descrito, analizadas según el método establecido por la farmacopea europea (EP).

| Tabla 6: Toma de pesos moleculares de las etapas del proceso |        |             |                 |             |
|--------------------------------------------------------------|--------|-------------|-----------------|-------------|
| Muestra                                                      | MW, Da | <2000 Da, % | 2000-8000 Da, % | >8000 Da, % |
| DR1 (retenido 1 diavolumen)                                  | 3703   | 27,40       | 66,42           | 6,20        |
| DR2 (retenido 2 diavolúmenes)                                | 3770   | 26,10       | 67,51           | 6,40        |
| DR3 (retenido 3 diavolúmenes)                                | 3807   | 25,00       | 68,51           | 6,50        |
| DR4 (retenido 4 diavolúmenes)                                | 3841   | 24,10       | 69,36           | 6,50        |
| DR5 (retenido 5 diavolúmenes)                                | 3856   | 23,50       | 69,93           | 6,50        |
| DR6 (retenido 6 diavolúmenes)                                | 3884   | 22,90       | 70,40           | 6,70        |
| CR1 (retenido concentración 10%)                             | 3889   | 22,20       | 71,24           | 6,60        |

| Tabla 6: Toma de pesos moleculares de las etapas del proceso |           |                |                    |                |
|--------------------------------------------------------------|-----------|----------------|--------------------|----------------|
| Muestra                                                      | MW,<br>Da | <2000 Da,<br>% | 2000-8000<br>Da, % | >8000 Da,<br>% |
| CR2 (retenido concentración 11%)                             | 3912      | 21,60          | 71,77              | 6,60           |
| CR3 (retenido concentración 12%)                             | 3954      | 20,70          | 72,54              | 6,80           |
| CR4 (retenido concentración 13%)                             | 3967      | 20,10          | 73,08              | 6,80           |
| CR5 (retenido concentración 14%)                             | 3995      | 19,30          | 73,78              | 6,90           |
| CR6 (retenido concentración 15%)                             | 4029      | 18,50          | 74,54              | 7,00           |

- La variación tanto en peso molecular medio como en la distribución de pesos moleculares es lineal desde el 10% hasta el 15% de concentración nominal del producto en el retenido, de modo que, ajustando el valor final de la concentración del producto en la solución del retenido, es posible definir un determinado perfil de pesos moleculares y distribución de cadenas oligosacáridicas para la obtención de enoxaparina sódica. La solución de retenido se liofiliza para obtener enoxaparina sódica seca.

#### Ejemplo 6

- 10 El producto obtenido en el ejemplo anterior se analiza para determinación de sus actividades anti-FXa y anti-FIIa. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

| Actividad anti-FXa, UI/mg sss | Actividad anti-FIIa, UI/ mg<br>sss | Ratio aFXa/a FIIa |
|-------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| 104                           | 26,8                               | 3,9               |

- En vista de la descripción anterior y los ejemplos, un experto en la materia podrá practicar la invención como se reivindica sin experimentación indebida. Lo anterior se entenderá mejor con referencia a los ejemplos anteriores que detallan ciertos procedimientos para la preparación de realizaciones de la presente invención. Todas las referencias hechas a estos ejemplos tienen fines ilustrativos. Los ejemplos no deben considerarse exhaustivos, sino meramente ilustrativos de solo algunas de las muchas realizaciones contempladas por la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se toma para significar  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  o  $\pm 1\%$  de un valor especificado, preferiblemente  $\pm 10\%$ . Además,

todos los rangos especificados en el presente documento incluyen los límites del rango y todos los valores enteros y fraccionarios, especialmente según la definición del término "aproximadamente".

**Reivindicaciones**

1. Procedimiento de obtención de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) con una distribución de peso molecular medio de entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 5,0 KDa que comprende las siguientes etapas:
  - 5 a) proporcionar una solución de heparina despolimerizada cruda con un rango de distribución de cadenas oligosacáridicas de entre aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10 KDa y una concentración de heparina de hasta aproximadamente 4% p/v;
  - b) realizar al menos una etapa de concentración mediante filtración de flujo tangencial (TFF) en fase acuosa utilizando una membrana de  $\leq 1$  KDa de corte nominal hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 25% p/v, proporcionando así dicha HBPM.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) se realiza una primera etapa de concentración mediante TFF hasta conseguir una concentración de la heparina de hasta aproximadamente 10% p/v y una segunda etapa de concentración mediante TFF hasta conseguir una concentración de la heparina de entre aproximadamente 10% a aproximadamente 25% p/v.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la segunda etapa de concentración se realiza hasta una concentración de heparina de entre aproximadamente 12% a aproximadamente 22% p/v.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se realiza una etapa de clarificación de la solución de heparina de la etapa (a).
- 25 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se realiza al menos una etapa de filtración de profundidad.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la etapa de filtración de profundidad se realiza previamente a la etapa de concentración mediante TFF si sólo se realiza una o previamente a la primera etapa de concentración mediante TFF si se realiza más de una etapa de concentración mediante TFF.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la etapa de filtración de

profundidad se realiza posteriormente a la etapa de concentración mediante TFF si sólo se realiza una o previamente a la primera etapa de concentración mediante TFF si se realiza más de una etapa de concentración mediante TFF.

- 5 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se realiza al menos una etapa de diafiltración con agua.
9. Procedimiento de obtención de heparinas según la reivindicación 8, en el que la etapa de diafiltración se realiza previamente a la etapa de concentración mediante TFF
- 10 si sólo se realiza una o previamente a la primera etapa de concentración mediante TFF si se realiza más de una etapa de concentración mediante TFF.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende al menos una etapa de tratamiento con  $H_2O_2$ .
- 15 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la etapa de tratamiento con  $H_2O_2$  se realiza posteriormente a la etapa de concentración mediante TFF si sólo se realiza una o previamente a la primera etapa de concentración mediante TFF si se realiza más de una etapa de concentración mediante TFF.
- 20 12. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la etapa de tratamiento con  $H_2O_2$  se realiza previamente a la etapa de concentración mediante TFF si sólo se realiza una o previamente a la primera etapa de concentración mediante TFF si se realiza más de una etapa de concentración mediante TFF.
- 25 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que se realiza una etapa de liofilización del concentrado obtenido.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la
- 30 heparina despolimerizada cruda no haya sido preparada por precipitación fraccionada.
15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que procedimiento entero excluye precipitación fraccionada de la heparina.
- 35 16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el peso molecular (Mw) de la HBPM obtenida cae dentro de los rangos siguientes

27

|      | Mw, Da    | M1<br><2000 Da, % | M2<br>2000-8000 Da, % | M3<br>>8000 Da, % |
|------|-----------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| HBPM | 3800-5000 | 12.0-20.0         | 68.0-82.0             | ≤18.0.            |

17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el peso molecular (Mw) de la heparina despolimerizada cruda cae dentro de los rangos siguientes

|                                | Mw, Da    | M1<br><2000 Da, % | M2<br>2000-8000 Da, % | M3<br>>8000 Da, % |
|--------------------------------|-----------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| heparina despolimerizada cruda | 3000-5000 | ≤25               | 60-80                 | ≤20.              |

18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el peso molecular (Mw) de la HBPM obtenida cae dentro de los rangos siguientes

|      | Mw, Da    | M1<br><2000 Da, % | M2<br>2000-6000 Da, % | M3<br>>6000 Da, % |
|------|-----------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| HBPM | 3000-4200 | <35.0             | 50.0-75.0             | <15.0.            |

10

19. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o 18, en el que el peso molecular (Mw) de la heparina despolimerizada cruda cae dentro de los rangos siguientes

|                                | Mw, Da    | M1<br><2000 Da, % | M2<br>2000-6000 Da, % | M3<br>>6000 Da, % |
|--------------------------------|-----------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| heparina despolimerizada cruda | 2500-5000 | <40               | 50-75                 | <25.              |

15

20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que en la concentración mediante filtración de flujo tangencial (TFF) se utiliza una membrana de 0,7 a 1 KDa.

- 20 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que se utiliza una membrana de

28

0,9 a 1 KDa, preferiblemente de 1KDa.

22. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que la heparina es enoxaparina sódica.

5