

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045709**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.19**

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

(21) Номер заявки  
**202292690**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.11.10**

---

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

---

(31) **PCT/ES2020/070271**

(56) ES-A1-2161615  
CN-A-102399379  
EP-A1-0040144  
ES-A6-2003197  
EP-A1-2881404  
EP-A1-2881404

(32) **2020.04.27**

(33) **ES**

(43) **2022.12.29**

(86) **PCT/ES2020/070695**

(87) **WO 2021/219907 2021.11.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЛАБОРАТОРИОС  
ФАРМАСЕУТИКОС РОВИ, С.А. (ES)**

LINHARDT ROBERT J. et al.: "Production and chemical processing of low molecular weight heparins", Seminars In Thrombosis And Hemostasis, 1999, 30/11/1998, vol. 25, № SUPPL. 3, p. 5-16, ISSN 0094-6176, the whole document

(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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в соотношении от 0,04 до 1,0 л H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина. Изобретение также относится к гепарину, полученному этим способом.

**B1**

**045709**

**045709**

**B1**

### 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 урановой кислоты (L-идурановой кислоты или D-глюкуроновой кислоты) и D-глюкозамина, попеременно связанных между собой. L-идурановая 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  $\beta$ -элиминации.

EP 0040144 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.

EP 1070503 описывает процесс получения НМГ с помощью способа, включающего стадии трансалкилирования соли гепарина в гепаринат бензалкония, деполимеризации в неводной среде с Triton В и очистки продукта.

EP 2881404 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 л  $H_2O_2$  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:

приготовление водного раствора гепарина натрия;

добавление хлорида бензалкония к раствору этапа (а), чтобы получить гепаринат бензалкония;

растворение гепарината бензалкония, полученного на этапе (b), в  $Cl_2CH_2$ , добавление Triton В и выдержка при 20-40°C в течение 24-48 ч; и

выполнение по меньшей мере двух обработок  $H_2O_2$  деполимеризованного гепарина, полученного на этапе (с), 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 Да, 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 изд.).

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-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопираноза (1,6-ангидро-глюкозамин) и 2-сульфо-амино-1,6-ангидро-2-дезоксид- $\beta$ -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 которой Mw - средневесовая молекулярная масса;

Mw<sub>x</sub> - молекулярная масса производного x (см. табл. 1097-1 в монографии "Эноксапарин натрия" ("Enoxaparin Sodium"), 1097, Европейская фармакопея, 9-е изд.);

A<sub>x</sub> - площадь пика производной x;

A<sub>1</sub> - площадь пика 1,6-ангидропроизводного ΔIS;

A<sub>2</sub> - площадь пика производного 1,6-ангидропроизводного ΔIIS;

A<sub>3</sub> - площадь пика 1,6-ангидропроизводного ΔIS-IS.

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

Анти-FXa и анти-FIIa активность НМГ по изобретению была определена с помощью хромогенного способа Европейской фармакопеи (Европейская фармакопея, 9-е изд., 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 ±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-FXa-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-FXa 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:

приготовление водного раствора гепарина натрия;

добавление хлорида бензалкония к раствору этапа (а), чтобы получить гепаринат бензалкония;

растворение гепаринат бензалкония, полученного на стадии (b), в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , добавление Triton В и выдержка при 20 до 40°C в течение 24-48 ч; и

выполнение по меньшей мере двух обработок  $\text{H}_2\text{O}_2$  деполимеризованного гепарина, полученного после этапа с), из расчета от 0,04 до 1,0 л  $\text{H}_2\text{O}_2$  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, т.е. 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 ч до второго добавления, после второго добавления реакция поддерживается в течение 12-20 ч до третьего добавления, и после третьего добавления реакция поддерживается в течение 6-10 ч. В другом варианте осуществления после первого добавления реакция поддерживается в течение 7-9 ч до второго добавления, после второго добавления реакция поддерживается в течение 14-18 ч до третьего добавления, а после третьего добавления реакция поддерживается в течение 7-9 ч. В другом дополнительном варианте осуществления время реакции после первого, второго и третьего добавления составляет примерно 8 ч, примерно 16 ч и примерно 8 ч соответственно.

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

В предпочтительном воплощении обработку  $\text{H}_2\text{O}_2$  на этапе d) проводят на водном растворе деполимеризованного гепарина.

Предпочтительно каждая обработка  $\text{H}_2\text{O}_2$  на этапе d) проводится при расходе от 0,04 до 0,5 л  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина, более предпочтительно от 0,04 до 0,3 л  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина. В конкретном варианте осуществления каждую обработку  $\text{H}_2\text{O}_2$  на стадии d) проводят из расчета от 0,04 до 0,2 л  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина. В предпочтительном варианте осуществления стадия d) включает первую обработку деполимеризованным гепарином  $\text{H}_2\text{O}_2$ , полученным после стадии с), в соотношении от 0,05 до 0,25 л  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина, и вторая обработка с использованием  $\text{H}_2\text{O}_2$  в соотношении от 0,04 до 0,25 л  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина.

В другом варианте осуществления стадия d) включает в себя три процедуры с  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

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

Предпочтительно каждую обработку  $\text{H}_2\text{O}_2$  проводить в течение не менее 3 ч. Например, от 3 до 20 ч. В конкретном варианте первая обработка  $\text{H}_2\text{O}_2$  проводится в течение 12-20 ч, предпочтительно 14-18 ч. Предпочтительно вторую и последующие обработки  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$  на стадии d). В конкретном варианте осуществления проводят две обработки  $\text{H}_2\text{O}_2$  и проводят стадию осаждения деполимеризованного гепарина в метаноле между двумя обработками  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В другом варианте осуществления проводят три обработки  $\text{H}_2\text{O}_2$  и проводят стадию осаждения деполимеризованного гепарина в метаноле между первой и второй обработками  $\text{H}_2\text{O}_2$  и между второй и третьей обработками  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Предпочтительно после первой обработки  $\text{H}_2\text{O}_2$  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

На фиг. 1 показан спектр  $^1\text{H}$  ЯМР НМГ, полученного по способу изобретения, с расширением аномерной зоны.

На фиг. 2 показан спектр  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  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 метилхлориде и регулируют температуру до  $30\pm 5^\circ\text{C}$ . 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 ч, второе на 16 ч, а третье еще на 8 ч.

При растворении деполимеризованного продукта и при pH от 10,5 до 11,5 добавляется  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об., в частности добавляется  $0,1\pm 10\%$  л  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг бензалкония гепарината, и дают прореагировать при 30% мас./об.  $\pm 5^\circ\text{C}$  в течение более 3 ч (от 14 до 18 ч). 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг, а именно добавляют  $0,08\pm 10\%$  л  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре  $40\pm 2^\circ\text{C}$  в течение более 3 ч (около 5 ч). По истечении периода реакции раствор нейтрализуется и осаждается метанолом.

Осадок повторно растворяют в очищенной воде и снова обрабатывают  $0,05\pm 10\%$  литра  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре  $40\pm 2^\circ\text{C}$  в течение более 3 ч (около 5 ч). 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 B 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  $\geq 6$ , 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 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 сублимацион-

ной сушкой.

Бензалкония гепаринат растворяют в метилхлориде и регулируют температуру до  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ . 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 ч, второе на 16 ч, а третье еще на 8 ч.

При растворении деполимеризованного продукта и при pH от 10,5 до 11,5 добавляется  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об., в частности добавляется  $0,1 \pm 10\%$  ли  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг бензалкония гепарината, и дают прореагировать при 30% мас./об.  $\pm 5^\circ\text{C}$  в течение 16 ч. 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг, а именно добавляют  $0,08 \pm 10\%$  л  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ . По истечении 5 ч 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  $\geq 6$ , 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 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  $\geq 6$ , 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 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  $\geq 6$ , 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 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  $\geq 6$ , 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 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-ангидрогликозамина 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  $\geq 6$ , 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 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-ангидрогликозамина 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  $\geq 6$ , 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 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-ангидрогликозамина 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  $\geq 6$ , 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.

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 метилхлориде и регулируют температуру до  $30 \pm 5^\circ C$ . 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 ч, второе на 16 ч, а третье еще на 8 ч.

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  $40 \pm 2^\circ C$  при pH 11. По истечении 5 ч 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-FXa-активностью 112 МЕ/мг и анти-FIIa-активностью 13,70 МЕ/мг и присутствует на восстановительном конце его олигосахаридных цепей со-

держание 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 LICО®, 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°C).

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  $60 \pm 5^\circ C$ . 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 ч, второе на 16 ч, а третье еще на 8 ч.

При растворении деполимеризованного продукта и при pH от 10,5 до 11,5 добавляется перекись водорода с концентрацией 33% мас./об./кг, в частности,  $0,1 \pm 10\%$  л  $H_2O_2$  добавляют с концентрацией 33% мас./об./кг бензалкония гепарината и оставляют для реакции при  $30 \pm 5^\circ C$  на 16 ч. 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  $0,08 \pm 10\%$  л  $H_2O_2$  33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре  $40 \pm 2^\circ C$ . По истечении 5 ч 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  $40 \pm 2^\circ C$  в течение примерно 5 ч. 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 LICО®, 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  $^1\text{H}$ -ЯМР и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC.

Спектроскопия  $^1\text{H}$ -ЯМР была наиболее широко используемым методом для изучения этих соединений из-за их богатых ядер и высокого гиромагнитного 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  $\beta$ -элиминации, они также содержат сигналы, соответствующие H4, с невосстанавливающими 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  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  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- $\beta$ -D-глюкопиранозы (1,6-ангидроглюкозамина или 1,6-ан.А) и 2-сульфоамино-1,6-ангидро-2-дезоксид- $\beta$ -D-манопиранозу (1,6-ангидроманозамин или 1,6-М) в соответствии с способом, известном в современном мире для экспериментов с  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, получены следующие результаты.

Пример	1,6-ан.А, % мол. (относительная дол.)	1,6-ан.М, % мол. (относительная дол.)	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 EP 1070503 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 л H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре 40±2°C (5 ч реакции) и на второй стадии 0,05 л H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33% мас./об./кг бензалкония гепарината при температуре 40±2°C в течение примерно 5 ч.

При воспроизведении примера 1 EP 1070503 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 EP 1070503, 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 EP 1070503 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 Фармакопеи (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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33% мас./об./кг гепарината бензалкония (или деполимеризованного гепарина) и в промежутках от 3 до 20 ч.

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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-ангидроглюкозаминных остатков была больше или равна доле 1,6-ангидроманозаминных остатков.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

а) приготовление водного раствора гепарина натрия;  
 б) добавление хлорида бензалкония к раствору этапа (а), чтобы получить гепаринат бензалкония;  
 с) растворение гепарината бензалкония, полученного на этапе (б), в  $Cl_2CH_2$ , добавление Triton В и выдержка при 20-40°C в течение 24-48 ч; и

д) выполнение по меньшей мере двух обработок  $H_2O_2$  деполимеризованного гепарина, полученного после этапа с), из расчета от 0,04 до 1,0 л  $H_2O_2$  33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина для каждой обработки,

в котором стадия (д) проводится при рН от 10,5 до 11,5 и предпочтительно в течение не менее 3 ч при каждой обработке с  $H_2O_2$ .

2. Способ по п.1, в котором добавление Triton В на этапе (с) 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 2, в котором температура этапа (с) составляет от 25 до 35°C, предпочтительно от 27 до 32°C.

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

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором каждая обработка  $H_2O_2$  на стадии д) 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 пп.1-5, в котором стадию (д) проводят при температуре от 20 до 50°C, предпочтительно от 25 до 45°C.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором стадия д) включает первую обработку деполимеризованным гепарином  $H_2O_2$ , полученным после стадии с), в соотношении от 0,05 до 0,25 л  $H_2O_2$  33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина и вторую обработку  $H_2O_2$  из расчета от 0,04 до 0,25 л  $H_2O_2$  33% мас./об./кг деполимеризованного гепарина.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором деполимеризованный гепарин осаждают в метаноле между каждой стадией обработки с  $H_2O_2$ .

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором полученный низкомолекулярный гепарин очищают осаждением метанолом.

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором полученный низкомолекулярный гепарин подвергается сублимационной сушке.

11. Низкомолекулярный гепарин со средней молекулярной массой от 3 до 3,8 кДа, имеющий на восстановительном конце своей олигосахаридной цепи содержание 1,6-ангидро остатков от 1 до 15%, полученный способом по любому из пп.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 4 до 11%.

13. Низкомолекулярный гепарин по п.11 или 12, в котором молярная доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или равна молярной доле остатков 1,6-ангидроманозамина.

14. Низкомолекулярный гепарин по любому из пп.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.

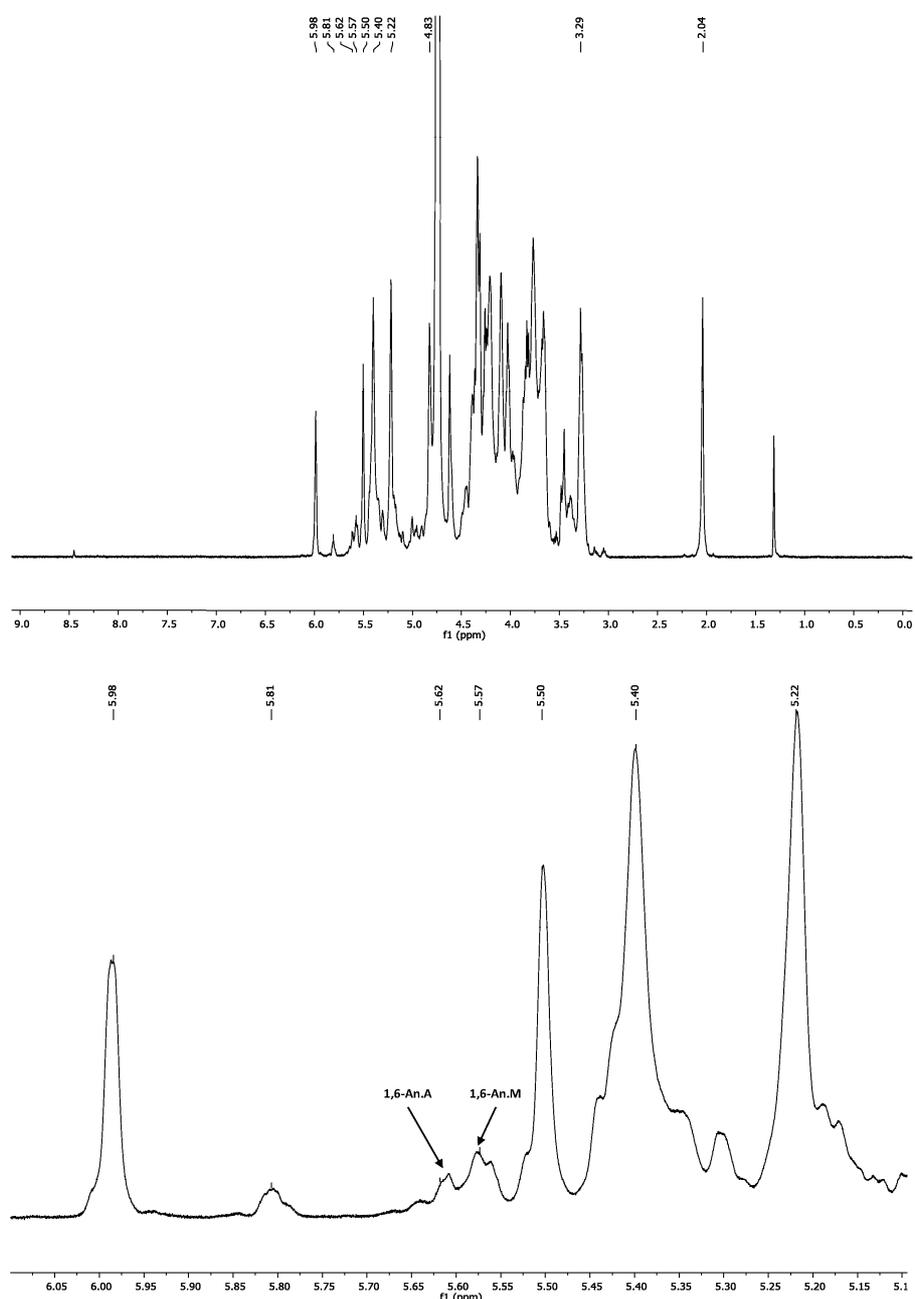
15. Низкомолекулярный гепарин по любому из пп.11-14, в котором указанный гепарин имеет степень окрашивания, превышающую или равную 6, в диапазоне эталонных растворов для окрашивания, установленных в Европейской Фармакопее 2.2.2. Метод II, в течение не менее 24 месяцев, предпочтительно в течение не менее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

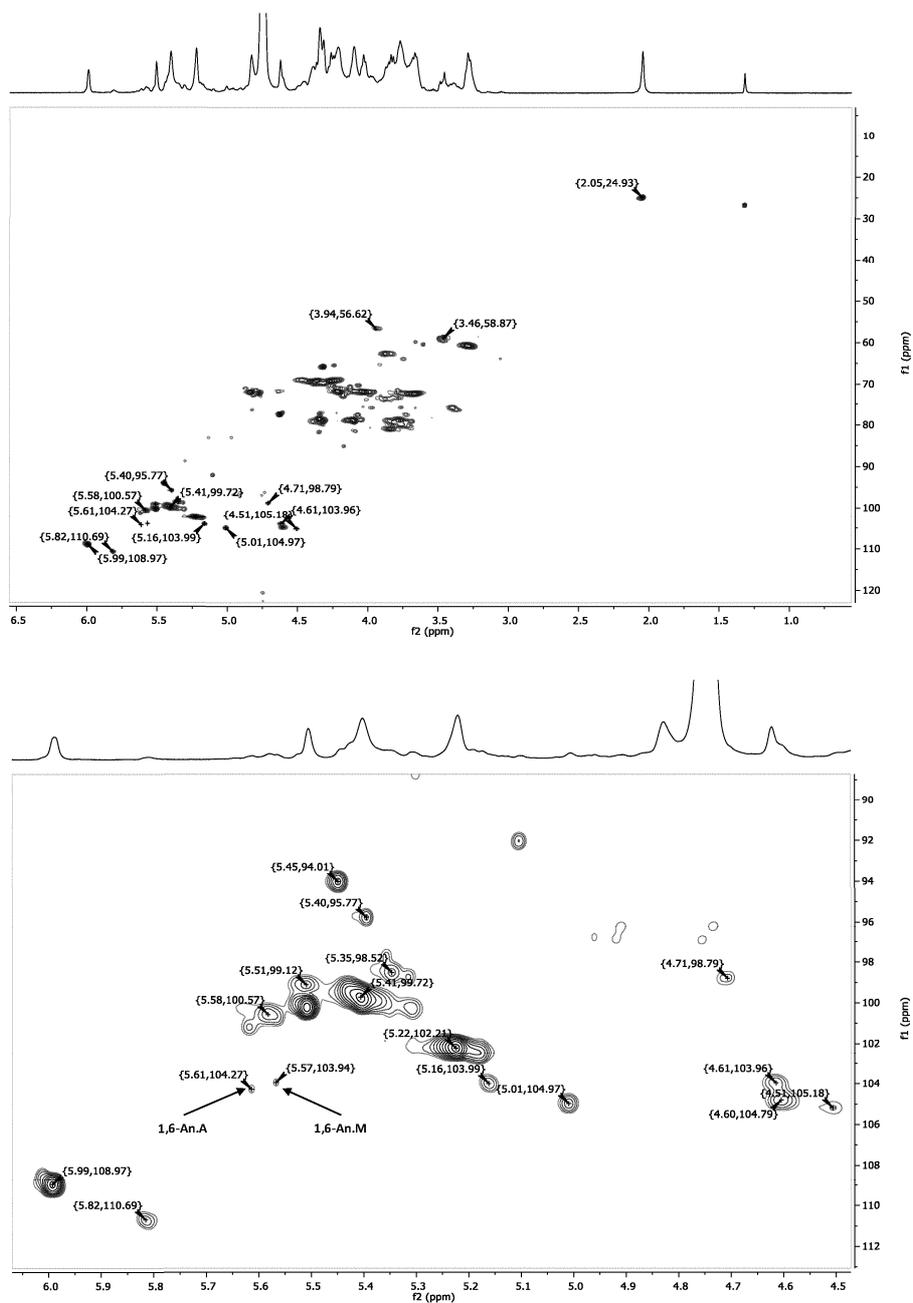
17. Низкомолекулярный гепарин по п.16, в котором молярная доля остатков 1,6-ангидроглюкозамина больше или равна доле остатков 1,6-ангидроманозамина.

18. Низкомолекулярный гепарин по п.16 или 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 пп.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



Фиг. 2

