

## Caracterización mediante Mapeo Oligosacárido de Heparinas de Bajo Peso Molecular obtenidas por Fragmentación Radicalaria

Esteban P. FUENTES \* y Víctor B. DIAZ

*Syntex S.A., Prayones y Avellaneda, Luis Guillón (1838),  
Provincia de Buenos Aires, Argentina*

---

**RESUMEN.** Se realizó el mapeo oligosacárido (degradación enzimática con heparinasa I y posterior análisis cromatográfico por intercambio iónico de los oligosacáridos resultantes) de tres heparinas de bajo peso molecular, dos de ellas de nuestra producción, obtenidas por fragmentación radicalaria. Se compararon los resultados obtenidos con la bibliografía y se analizaron las semejanzas entre los productos obtenidos por dos métodos de depolimerización diferentes, peroxidólisis vía agua oxigenada y termólisis del ácido hipocloroso, ambos basados en fragmentaciones moleculares donde intervienen radicales libres.

**SUMMARY.** "Oligosaccharide Mapping of Low Molecular Weight Heparins obtained by Free Radical-Based Fragmentation Methods". Oligosaccharide mapping (heparinase I enzymatic cleavage and further ion exchange chromatographic analysis of the resulting oligosaccharides) was performed on three low molecular weight heparins samples, two of them from our own production, obtained by free radical based fragmentation. The results were compared with bibliographic data. Similarities between the products obtained by two different free radical-based fragmentations methods, peroxidolysis via reaction with hydrogen peroxide and hypochlorous acid thermolysis, were analyzed.

---

### INTRODUCCION

La heparina es una familia de polisacáridos cuyas cadenas lineales están constituidas por D-glucosamina unida por enlace 1→4 a un ácido hexurónico. El resto de ácido hexurónico es mayoritariamente L-idurónico o D-glucurónico. Los residuos glucosamínicos son mayoritariamente N-sulfatados o N-acetilados <sup>1</sup>. Desde hace varias décadas su principal uso farmacéutico es como anticoagulante en transfusiones o en la profilaxis de desórdenes tromboembólicos, con excelente tolerancia, aunque se han descrito efectos colaterales indeseados <sup>2</sup>. La heparina de bajo peso molecular (hbpm) es el principal derivado semisintético de la heparina

**PALABRAS CLAVE:** Caracterización, Fragmentación Radicalaria, Heparina de Bajo Peso Molecular, HPLC, Mapeo Oligosacárido.

**KEY WORDS:** Characterization, Free Radical Based-Fragmentation, HPLC, Low Molecular Weight Heparin, Oligosaccharide Mapping.

\* Autor a quien deberá ser dirigida la correspondencia

y ha sido introducido en el mercado en la primer mitad de la década del '80, disminuyendo notablemente el riesgo hemorrágico y otros efectos colaterales de la heparina, y aportando otras ventajas, como las relacionadas con la actividad frente a las plaquetas y el mayor tiempo de vida media en circulación. Su uso se ha generalizado en el tratamiento de la trombosis arterial y postquirúrgica y en los trastornos cardiovasculares <sup>3</sup>.

Con el tiempo, la oferta de preparaciones comerciales de hbpm ha aumentado. Estos productos se diferencian en sus métodos de producción y, por ende, en sus estructuras químicas. Aunque sus actividades biológicas pretendan ser similares, los perfiles farmacológicos no son idénticos. Las principales hbpm comercializadas y sus métodos de obtención se presentan en la Tabla 1.

<i>método de obtención</i>	<i>nombre comercial</i>
depolymerización con ácido nitroso	<i>Fraxiparin®</i> (Nadroparin Calcium(*), CY 216) (Sanofi, París, Francia) <i>Fragmin®</i> (Dalteparin Sodium(*), Kabi 2165) (Kabi, Estocolmo, Suecia) <i>Reviparin(*)</i> (Knoll, Ludwigshafen, Alemania)
bencilación y posterior depolymerización ( $\beta$ -eliminación) en medio alcalino	<i>Clexane®</i> , <i>Lovenox®</i> (Enoxaparin Sodium (*), PK10169) (Rhone-Poulanc, París, Francia)
peroxidolisis (vía H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	<i>Fluxum®</i> (Pamaparin Sodium (*), OP 2123) (Opocrin, Corlo, Italia) <i>Ardeparin (*)</i> (RD heparin) (Wyeth-Hepar, EE.UU.)
digestión enzimática con heparinasa	<i>Logiparin®</i> (Tinzaparin Sodium (*), LHN-1) (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca) <i>Innobep®</i> (Tinzaparin Sodium (*), LHN-1) (Leo, Copenhagen, Dinamarca)
depolymerización con nitrito de isoamiló	<i>Mono Embolox NM®</i> (Sandoz AG, Nurnberg, Alemania)

(\*) rINN (recommended International Nonproprietary Name, Denominación Común Internacional).

**Tabla 1.** Métodos característicos de obtención de hbpm y productos farmacéuticos generados <sup>2,3</sup>

La caracterización estructural de la heparina es una tarea sumamente compleja, debido tanto a que sus monosacáridos constituyentes no se alternan en una secuencia constante (fundamentalmente los ácidos hexurónicos), como a su variable grado de sulfatación. Los mayores éxitos con estas sustancias fueron obtenidos con técnicas de resonancia magnética nuclear <sup>4,5</sup>, mediante el mapeo oligosacárido <sup>6-8</sup> y a través del análisis cromatográfico de sus productos de degradación con ácido nitroso <sup>9</sup>. En los últimos años estas técnicas fueron combinadas, en la búsqueda de análisis más exhaustivos. Los oligosacáridos obtenidos por degradación enzimática y aislados por cromatografía de intercambio iónico fueron caracterizados, a modo de ejemplo, por correlación espectroscópica (2D COSY-NMR, *two dimensional correlated spectroscopy-nuclear magnetic resonance*) y mediante espectrometría de masa (FAB-MS, *fast atom bombardment-mass spectrometry*) <sup>10,11</sup>.

Los patrones estructurales obtenidos por las técnicas mencionadas se han visto complicados al aplicar estas metodologías de caracterización a la hbpm, debido a las diferentes alteraciones que en mayor o menor medida producen en la molécula los distintos métodos de obtención. Así, la identificación de una determinada hbpm resulta una tarea compleja, aunque el mapeo oligosacárido constituye una herramienta muy valiosa y accesible a cualquier laboratorio analítico medianamente equipado <sup>6,12</sup>.

La caracterización de una hbpm obtenida por peroxidolisis (escisión de intermediarios peroxídicos con generación de radicales libres) <sup>13</sup> con técnicas de mapeo oligosacárido ya ha sido descripta con anterioridad <sup>6</sup>. En nuestro laboratorio hemos desarrollado dos nuevos métodos de obtención de heparinas de bajo peso molecular: el primero de ellos por peroxidolisis vía descomposición del agua oxigenada <sup>14,15</sup> y el otro por descomposición termolítica del ácido hipocloroso en solución acuosa, lo cual genera radicales libres oxigenados, produciendo la fragmentación radicalaria del correspondiente polisacárido <sup>16,17</sup>. En el presente trabajo se muestran los resultados de la aplicación de las técnicas de mapeo oligosacárido a la caracterización estructural de hbpm de nuestra producción, y su comparación con resultados similares obtenidos de la bibliografía. Se presenta también la caracterización de Fluxum® (Opocrin-Alfa Wassermann), especialidad medicinal presente en el mercado europeo y obtenida por peroxidolisis <sup>21</sup>.

## MATERIALES Y METODOS

Heparina inyectable de mucosa intestinal bovina (lote 2644/I, 153 ui/mg), heparina inyectable de mucosa intestinal porcina (pool de lotes, 180 ui/mg), hbpm (lote S325, peroxidolisis vía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; lote S336-B, fragmentación radicalaria vía termolisis del ácido hipocloroso), fueron obtenidas en nuestro laboratorio. Las heparinas bovina y porcina tomadas como patrones de referencia fueron purificadas mediante una precipitación con acetato de potasio 3M de pH 5,6 <sup>18,19</sup>, de manera de eliminar posibles impurificaciones con heparan sulfato y galactosaminoglicanos remanentes de su producción. El análisis de Fluxum® se realizó sobre una muestra tomada del producto disponible en el mercado europeo. Heparinasa I (EC 4.2.2.7., *Flavobacterium heparinum*) fue adquirida a Sigma Chemical Co. El resto de los reactivos es de calidad analítica.

La degradación enzimática se realizó incubando 5 ml de una solución de 10 mg/ml de heparina o hbpm en agua con 25 ml de una solución de heparinasa I de 25 ui/ml, durante 2,5 h a 30 °C. La enzima utilizada se disolvió en buffer Tris-HCl 20 mM conteniendo cloruro de sodio 50 mM, cloruro de calcio 4 mM y albúmina bovina 0,01% (pH 7,5).

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo líquido (HPLC) marca Hewlett-Packard, modelo 1050 equipado con un detector de longitud de onda múltiple, con detección UV a 232 nm. La separación se realizó sobre una columna Spherisorb SAX Phenomenex (intercambiadora aniónica fuerte), 5 m, 250 x 4,6 mm, con un gradiente lineal de cloruro de sodio según el siguiente programa : 0 - 5 min, 100% A; 5 - 60 min, de 100% de A a 100% de B (A = NaCl 0,1 M; B = NaCl 1,5 M). La identificación de los picos cromatográficos se realizó comparando el perfil cromatográfico obtenido con los datos que aporta la bibliografía <sup>6,20</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En las Figuras 1A y 1B se pueden observar los cromatogramas de mapeo oligosacárido característicos de heparinas bovina y porcina. Desde un punto de vista cualitativo, ambos cromatogramas son muy similares. En los dos casos los picos más importantes corresponden a los mismos oligosacáridos, cuyas estructuras se detallan a continuación,

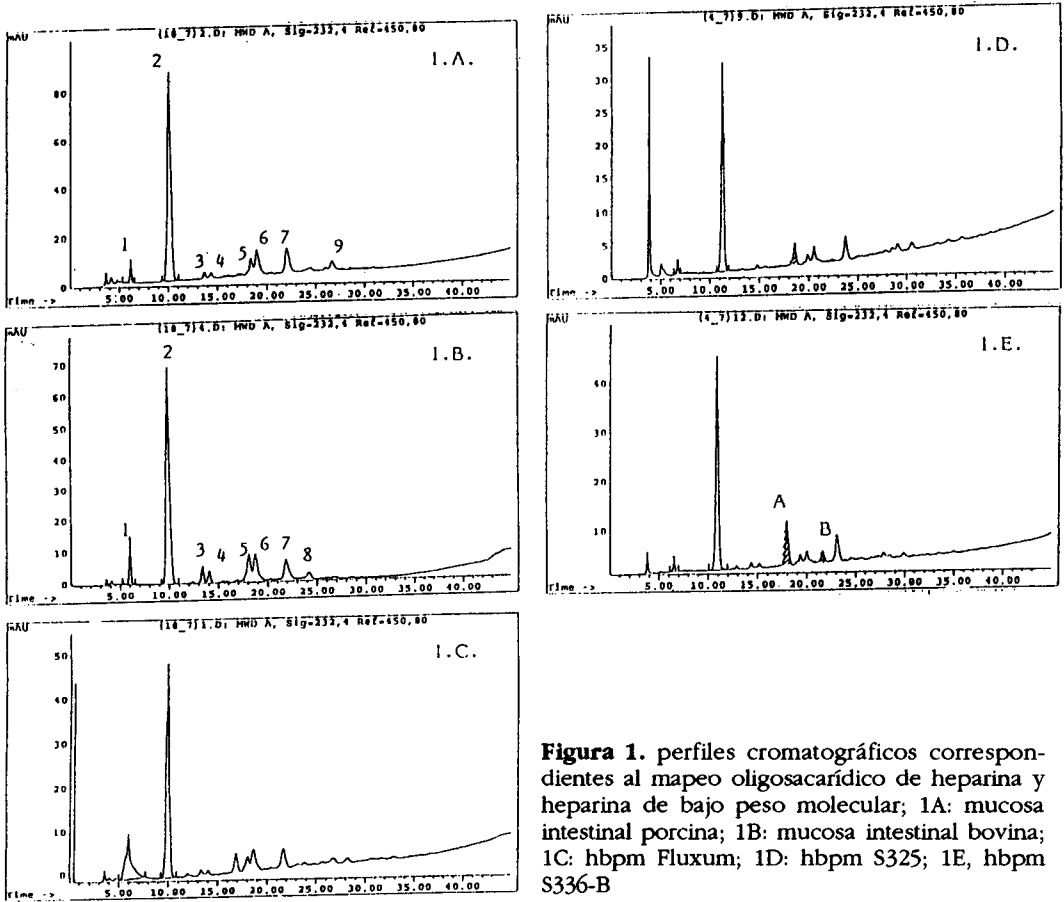
- 1,  $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}$ ;
- 2,  $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}$ ;
- 3,  $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}$ ;
- 4,  $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}$ ;
- 5,  $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}$ ;
- 6,  $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}$ ;
- 7,  $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}$ ;
- 8,  $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}3\text{S}6\text{S}$ ;
- 9,  $\Delta\text{UA}2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc}6\text{S}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}2\text{S}3\text{S}6\text{S}$ .

donde  $\Delta\text{UA}2\text{S}$  = ácido 4-deoxi-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-treo-hex-4-enopiranosilurónico,  $\text{GlcA}$  = ácido glucurónico,  $\text{IdoA}$  = ácido idurónico,  $\text{IdoA}2\text{S}$  = ácido idurónico-2-O-sulfato,  $\text{GlcN}2\text{S}$  = glucosamina -2-N-sulfato,  $\text{GlcN}2\text{S}6\text{S}$  = glucosamina-2-N-sulfato-6-O-sulfato y  $\text{GlcN}2\text{S}3\text{S}6\text{S}$  = glucosamina-2-N-sulfato-3,6-di-O-sulfato.

Cuando la misma técnica fue aplicada a dos hbpm obtenidas por peroxidolisis vía  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig 1C, Fluxum, y Fig 1D, S325), se obtuvieron cromatogramas similares, en perfecto acuerdo con la bibliografía <sup>6</sup>. Se puede observar con claridad la aparición de un pico anómalo (pico A), mientras que un segundo pico solamente se insinúa (ver más adelante). En la misma referencia <sup>6</sup> se encuentra la estructura propuesta para este oligosacárido, producto de una degradación parcial de la molécula durante la depolimerización.

El hecho de que dos procesos químicos análogos, generadores de dos métodos de depolimerización diferentes <sup>14,21</sup>, determinen la misma alteración en la estructura inicial de la heparina, sugiere un camino de reacciones común, o al menos estrechamente relacionado, para ambas reacciones peroxidolíticas mediante la utilización de agua oxigenada como reactivo.

Por otra parte, al analizar la muestra S336-B, correspondiente a hbpm obtenida por depolimerización vía termolisis del ácido hipocloroso (Fig. 1E), se observa una fuerte presencia del pico anómalo (A) al mismo tiempo que la aparición del pico señalado como B en el gráfico. Este último pico se insinúa en los cromatogramas de las hbpm obtenidas por peroxidolisis y no fue identificado. Tal similitud en los patrones de degradación permiten suponer que ambos métodos de procesamiento, esto es, la peroxidolisis con agua oxigenada y la depolimerización con ácido hipocloroso, transcurren por mecanismos de reacción similares (produciendo la fragmentación del polisacárido por el ataque de radicales oxhidrilo generados en el medio de reacción).



**Figura 1.** perfiles cromatográficos correspondientes al mapeo oligosacárido de heparina y heparina de bajo peso molecular; 1A: mucosa intestinal porcina; 1B: mucosa intestinal bovina; 1C: hbpm Fluxum; 1D: hbpm S325; 1E, hbpm S336-B

Finalmente, esta metodología de análisis constituye una interesante posibilidad para la identificación de hbpm obtenidas por las dos vías mencionadas.

**CONCLUSIONES**

Se ha efectuado el mapeo oligosacárido de heparinas de bajo peso molecular obtenidas por fragmentación radicalaria (termolisis del ácido hipocloroso y peroxidolisis vía agua oxigenada). Los resultados del análisis practicado sobre muestras obtenidas vía peroxidolisis están en perfecto acuerdo con la bibliografía publicada. En particular, productos obtenidos por métodos peroxidolíticos distintos vía descomposición del agua oxigenada muestran iguales perfiles cromatográficos.

Por otra parte, el mismo examen fue realizado sobre muestras de hbpm obtenidas vía termolisis del ácido hipocloroso. La comparación de los resultados cromatográficos correspondientes a todos los procesos radicalarios citados muestra una marcada similitud. Esto sugiere que las fragmentaciones radicalarias de heparina conocidas transcurren por mecanismos de reacción similares o estrechamente relacionados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Casu, B (1989) "Methods of structural analysis" en "Heparin, chemical and biological properties, clinical applications" (D. A. Lane y U. Lindhal, eds.), Edward Arnold, London, pág 25
2. Heparin (1993) en "Martindale, the extra pharmacopoeia 30 edition" (J.E.F. Reynolds, ed.), The Pharmaceutical Press, London, págs. 227 y siguientes
3. Fareed, J., D. A. Hoppensteadt & J.M. Walenga (1993) *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **19**: 1-11
4. Casu, B (1989) "Methods of structural analysis" en "Heparin, chemical and biological properties, clinical applications" (D.A. Lane y U. Lindhal, eds.), Edward Arnold, London, pág 32
5. Casu, B (1989) *Annals of The New York Academy of Sciences* **556**: 1-17
6. Linhardt, R.J., D. Loganathan, A. Al-Hakim, H. Wang, J.M. Walenga, D. Hoppensteadt & J. Fareed (1990) *J. Med. Chem.* **33**: 1639-45
7. Linhardt, R.J., K.G. Rice, Y.S. Kim, D.L. Lohse, H.M. Wang & D. Loganathan (1988) *Biochem. J.* **254**:781-7
8. Yoshida, K., S.Miyauchi, H. Kikuchi, A. Tawada & K. Tokuyasu (1989) *Anal. Biochem* **177**: 327-32
9. Guo, Y. & H.E. Conrad (1989) *Anal. Biochem.* **176** : 96-104
10. Sugahara, K., S. Yamada, K. Yoshida, P. de Waard & J.F.G. Vliegthart (1992) *J. Biol. Chem* **267**: 1528-33
11. Yamada, S., K.Yoshida, M. Sugiura, K. Sugahara, K.H. Khoo, H.R. Morris & A. Dell (1993) *J. Biol. Chem* **268**: 4780-7
12. Linhardt, R. J., H. Wang & S. Ampofo (1992) "New methodologies in heparin structure analysis and the generation of LMW heparins" en "Heparin and Related Polysaccharides" (D.A. Lane, I. Bjork y U. Lindhal, eds.) Plenum Press, New York, 37-47
13. Fussi, F. & G. Ceppi (1986) *Bolletino Chimico Farmaceutico* **125**: 339-45
14. Díaz, V., R. Dománico & F Fussi (1993) patente argentina N° 243540
15. Haber, F. & J. Weiss (1934) *Proc. Roy. Soc. London* **147**: 332-51
16. Díaz, V., R. Dománico & F. Fussi (1993) European Patent N° 268885
17. Díaz, V., R. Dománico & F. Fussi (1990) US patent N° 4977250
18. Scott, J.E. (1967) U. K. patent 1221784
19. Casu, B., M. Moretti, P. Oreste, A. Riva, G.Torri & J. R. Vercelloti (1980) *Arzneim.-Forsch./Drug. Res.* **30**: 1889-92
20. Linhardt, R. J., H. Wang, D. Loganathan, & J. Bae (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 2380-7
21. Mascellani, G. & P. Bianchini (1986) International Patent WO 86/06729