

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional  
**WO 2021/219902 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
04 de noviembre de 2021 (04.11.2021) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación internacional de patentes:  
C08B 37/10 (2006.01)

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2020/070271

(22) Fecha de presentación internacional:  
27 de abril de 2020 (27.04.2020)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante: **LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ROVI, S.A.** [ES/ES]; Julián Camarillo, 35, E-28037 Madrid (ES).

(72) Inventores: **FRANCO RODRÍGUEZ, Guillermo**; LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ROVI, S.A., Julián Camarillo, 35, E-28037 Madrid (ES). **GUTIERRO ADURIZ, Ibon**; LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ROVI, S.A., Julián Camarillo, 35, E-28037 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Intellectual Property Law, S.L., Avda. de Burgos, 16D, Edificio EUROMOR, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING LOW-MOLECULAR-WEIGHT HEPARINS AND LOW-MOLECULAR-WEIGHT HEPARINS OBTAINED BY SAME

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR Y HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR OBTENIDAS POR EL MISMO

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining highly stable low-molecular-weight heparins. The method includes the treatment of depolymerised heparin with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a rate of between 0.02 and 1.7 litres of 33% w/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per kg of depolymerised heparin. The invention also relates to a heparin obtained using this method.

(57) Resumen: La invención se refiere a un procedimiento de obtención de heparinas de bajo peso molecular que presentan una gran estabilidad. El procedimiento incluye el tratamiento de heparina despolimerizada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una proporción de entre 0,02 y 1,7 litros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada. La invención se dirige también a una heparina obtenida por este procedimiento.



WO 2021/219902 A1

## PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR Y HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR OBTENIDAS POR EL MISMO

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y a las heparinas de bajo peso molecular obtenidas por ese procedimiento.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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. 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), HBPM y heparina de muy bajo peso molecular (HMBPM). Las HBPM y HMBPM provienen de la despolimerización de la molécula original de HNF. En el estado de la técnica se han descrito varios métodos para la preparación de HBPM. Uno de ellos corresponde a la despolimerización alcalina por un mecanismo de  $\beta$ -eliminación.

EP0040144 describe un proceso de obtención de HBPM mediante un procedimiento que comprende las etapas de transalificación de una sal de heparina en heparinato de bencetonio, esterificación del heparinato de bencetonio con cloruro de bencilo, purificación y obtención de la sal sódica del éster bencílico de la heparina, despolimerización con hidróxido de sodio con saponificación del éster y purificación del producto.

EP1070503 describe un proceso de obtención de HBPM mediante un procedimiento que comprende las etapas de transalificación de una sal de heparina en heparinato de benzalconio, despolimerización en medio no acuoso con Triton B y purificación del producto.

EP2881404 describe un proceso de obtención de HBPM que comprende una primera etapa de transalificación, una despolimerización con una base fosfaceno o una base derivada de la guanidina y una última transalificación.

Existe la necesidad de procesos más reproducibles y estables que permitan la obtención de HBPM, especialmente de HBPM con una mayor estabilidad.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han encontrado un método de preparación de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) que presentan una estabilidad superior, mientras que mantienen una buena actividad anti-FXa y anti-FIIa. Este método de preparación de HBPM comprende el tratamiento de la heparina despolimerizada cruda con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en una proporción de entre 0,02 y 1,7 litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada.

Por lo tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a un procedimiento de obtención de heparinas de bajo peso molecular con un peso molecular medio de entre 3 y 3,8 KDa, que comprende las siguientes etapas:

- a) preparar una solución acuosa de heparina sódica;
- b) añadir cloruro de benzalconio a la solución de la etapa (a) para obtener heparinato de benzalconio;
- c) disolver el heparinato de benzalconio obtenido en la etapa (b) en  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ , añadir Triton B y mantener una temperatura de entre 20 y 40°C durante entre 24 y 48 horas; y
- d) realizar al menos dos tratamientos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  de la heparina despolimerizada obtenida en la etapa c) en una razón de entre 0,02 y 1,7 litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada, en cada tratamiento.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una heparina de bajo peso molecular obtenible mediante el procedimiento de la invención.

Se ha encontrado que las HBPM obtenidas presentan un contenido de residuos 1,6-anhidro de entre 1 y 15%. Por lo tanto, un tercer aspecto de la invención se refiere a una heparina de bajo peso molecular con un peso molecular medio de entre 3 y 3,8 KDa que presenta un contenido de residuos 1,6-anhidro de entre 1 y 15 % en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas.

Las definiciones y realizaciones descritas para un aspecto, aplican igualmente al resto de aspectos de la invención.

En la presente invención se entiende como "heparina de bajo peso molecular" o "HBPM" a la definición recogida en el documento Heparins, Low-Molecular-Mass

monograph, 0828, European Pharmacopeia 9th Ed., como la mezcla de polisacáridos obtenida de la heparina y que tiene un peso molecular medio menor de 8.000 Dalton y donde al menos el 60% de su masa total tiene un peso molecular menor de 8.000 Da. El peso molecular medio de las HBPM de la invención se ha determinado por el procedimiento de la Farmacopea Europea (Ph. Eur. 9ª Edición).

En la presente invención se entiende como “residuos 1,6-anhidro” a diversos grupos químicos que se generan en las posiciones terminales de las HPBM durante el proceso de despolimerización. Ejemplos no limitantes de estos grupos son 2-sulfo-amino-1,6-anhidro-2-desoxi-β-D-glucopiranos (1,6-anhidroglucosamina) y 2-sulfo-amino-1,6-anhidro-2-desoxi-β-D-manopiranos (1,6-anhidromanosamina). La cantidad de estos residuos en la HPBM se expresa como el porcentaje de cadenas de oligosacárido que en su terminal reductor presentan estos tipos de residuos.

El contenido en terminales 1,6-anhidro de la HBPM puede obtenerse mediante el método analítico descrito en el documento Enoxaparin Sodium monograph, 1097, European Pharmacopeia 9th Ed, descrito en el apartado Identificación B. En este método se despolimeriza exhaustivamente la molécula con una mezcla de heparinasas I, II y III, separándose y cuantificándose los residuos generados por cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC). El contenido en 1,6-anhidro, por ejemplo, se determina de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

donde:

- Mw, peso molecular medio
- Mw<sub>x</sub>, peso molecular del derivado x (ver tabla 1097-1 del documento Enoxaparin Sodium monograph, 1097, European Pharmacopeia 9th Ed)
- A<sub>x</sub>, área del pico del derivado x
- A<sub>1</sub>, área del pico del derivado 1,6-anhidro ΔIS
- A<sub>2</sub>, área del pico del derivado 1,6-anhidro ΔIIS
- A<sub>3</sub>, área del pico del derivado 1,6-anhidro ΔIS-IS

La proporción de residuos 1,6-anhidroglucosamina y de residuos 1,6-anhidromanosamina en la HBPM se puede determinar mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), por ejemplo mediante <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C HSQC. La proporción entre ambos residuos se puede determinar integrando las señales correspondientes a cada uno de estos residuos en el espectro de <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C HSQC.

La actividad anti-FXa y anti-FIIa de las HBPM de la invención se ha determinado por el procedimiento cromogénico de la Farmacopea Europea (Ph. Eur. 9ª Edición, Monografía 0828) y se ha expresado en unidades internacionales por mg.

El grado de color de la HBPM se puede determinar según el método II de la Farmacopea Europea capítulo 2.2.2.

El término "temperatura ambiente" se refiere a una temperatura de entre 20 y 25°C.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa  $\pm 10\%$  del valor dado.

Las HBPM de la invención tienen un peso molecular medio (Mw) de entre 3 y 3,8 KDa, preferiblemente de entre 3 y 3,6 KDa.

En una realización, la HBPM de la invención presenta un contenido de residuos 1,6-anhidro de entre 1 y 15% en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas; preferiblemente de entre 2 y 13%, más preferiblemente de entre 4 y 11%.

Preferiblemente, la proporción molar de los residuos 1,6-anhidroglucosamina en la HBPM de la invención es mayor o igual a la de los residuos 1,6 anhidromanosamina. En una realización particular, la proporción molar de residuos 1,6-anhidroglucosamina:residuos 1,6 anhidromanosamina en la HBPM es de entre 1:1 y 3:1, preferiblemente entre 1:1 y 2,5:1 o entre 1,05:1 y 2,5:1.

En una realización particular de la invención, la HBPM tienen un peso molecular medio de entre 3 y 3,8 KDa, un contenido de residuos 1,6-anhidro de entre 1 y 15% en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas, y una proporción de residuos 1,6-anhidroglucosamina mayor o igual a la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, preferiblemente entre 1:1 y 3:1.

Preferiblemente, la HBPM de la invención presenta una actividad anti-FXa de entre 80-120 UI/mg y una actividad anti-FIIa de entre 5-20 UI/mg. En una realización particular, presenta una actividad anti-FXa de entre 95-120 UI/mg y una actividad anti-FIIa de entre 10-20 UI/mg.

En una realización particular de la invención, la HBPM tienen un peso molecular medio de entre 3 y 3,8 KDa, un contenido de residuos 1,6-anhidro de entre 1 y 15% en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas, y una proporción de residuos 1,6-anhidroglucosamina mayor o igual a la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, preferiblemente entre 1:1 y 3:1, una actividad anti-FXa de entre 80-120 UI/mg y una actividad anti-FIIa de entre 5-20 UI/mg.

Preferiblemente, la HBPM de la invención presenta un grado de color mayor o igual a 6 en la gama de soluciones de referencia del color establecidas en Farmacopea

Europea capítulo 2.2.2. (método II), durante al menos 24 meses, preferiblemente durante al menos 36 meses, a temperatura ambiente y 60% de humedad relativa. Esta determinación se puede hacer siguiendo el método descrito en la Farmacopea Europea (capítulo 2.2.2; método II), o de forma automática utilizando un colorímetro.

Se ha observado que las HBPM de la invención presentan una elevada estabilidad. En concreto, se ha observado que son estables durante al menos 24 meses, o incluso durante al menos 36 meses a temperatura ambiente y 60% de humedad relativa.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de heparinas de bajo peso molecular con un peso molecular medio de entre 3 y 3,8 KDa que comprende las siguientes etapas:

- a) preparar una solución acuosa de heparina sódica;
- b) añadir cloruro de benzalconio a la solución de la etapa (a) para obtener heparinato de benzalconio;
- c) disolver el heparinato de benzalconio obtenido en la etapa (b) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , añadir Triton B y mantener una temperatura de entre 20 y 40°C durante entre 24 y 48 horas; y
- d) realizar al menos dos tratamientos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  de la heparina despolimerizada obtenida tras la etapa c) en una razón de entre 0,04 y 1,0 litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada, en cada tratamiento.

Realizaciones particulares y preferidas para la heparina de bajo peso molecular son tal y como se han definido previamente en este documento.

En una realización particular, la solución acuosa de heparina sódica de la etapa a) se prepara a partir de heparina obtenida de la mucosa intestinal del cerdo.

La adición de Tritón B en la etapa c) puede hacer mediante una o varias adiciones secuenciales, por ejemplo mediante 1, 2, 3 o 4 adiciones secuenciales de Tritón B.

En una realización particular, la adición de Tritón B en la etapa c) se realiza en un máximo de tres adiciones secuenciales, i.e. 1, 2 o 3, cada una de ellas con la adición de Triton B en una razón en peso de 0,2:1 a 0,3:1 de Triton B:heparinato de benzalconio. Preferiblemente, la adición de Tritón B en la etapa c) se realiza mediante tres adiciones secuenciales de Tritón B, y preferiblemente cada una de ellas con la adición de Triton B en una razón en peso de 0,2:1 a 0,3:1 de Triton B:heparinato de benzalconio.

En una realización de la invención, la adición de Tritón B en la etapa c) se realiza mediante tres adiciones secuenciales de Triton B, de forma que tras la primera adición

se mantiene la reacción durante 6-10 horas hasta la segunda adición, tras la segunda adición se mantiene la reacción durante 12-20 horas hasta la tercera adición, y tras la tercera adición se mantiene la reacción durante 6-10 horas. En una realización adicional, tras la primera adición se mantiene la reacción durante 7-9 horas hasta la segunda adición, tras la segunda adición se mantiene la reacción durante 14-18 horas hasta la tercera adición, y tras la tercera adición se mantiene la reacción durante 7-9 horas. En otra realización adicional, el tiempo de reacción tras la primera, segunda y tercera adición es de aproximadamente 8, aproximadamente 16 y aproximadamente 8 horas, respectivamente.

En una realización, la temperatura en la etapa c) es de entre 25 y 35 °C, preferiblemente entre 27 y 32 °C.

En una realización preferida, el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la etapa d) se lleva a cabo sobre una disolución acuosa de la heparina despolimerizada.

Preferiblemente, cada tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la etapa d) se realiza con una razón de entre 0,04 y 0,5 litros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada, preferiblemente entre 0,04 y 0,3 litros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada. En una realización particular, cada tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la etapa d) se realiza con una razón de entre 0,04 y 0,2 litros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada. En una realización preferida, la etapa d) comprende un primer tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la heparina despolimerizada obtenida tras la etapa c) en una razón de entre 0,05 y 0,25 litros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada, y un segundo tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una razón de entre 0,04 y 0,25 litros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada.

En otra realización, la etapa d) incluye tres tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Preferiblemente, la etapa d) se lleva a cabo a una temperatura de entre 20 y 50 °C, preferiblemente entre 25 y 45 °C.

Preferiblemente, cada tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realiza durante al menos 3 horas. Por ejemplo, durante entre 3 y 20 horas. En una realización particular, el primer tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realiza durante un tiempo de entre 12 y 20 h, preferiblemente entre 14 y 18 h. Preferiblemente, el segundo y posteriores tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizan durante un tiempo de entre 3 y 7 h, preferiblemente entre 4 y 6 h.

En una realización preferida, la etapa d) se lleva a cabo a un pH entre 10,5 y 11,5. Adicionalmente, el procedimiento de la invención puede incluir una etapa adicional de precipitación en metanol de la heparina despolimerizada después de cada tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la etapa d). En una realización particular, se llevan a cabo dos tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se realiza una etapa de precipitación en metanol de la heparina

despolimerizada entre los dos tratamientos con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En otra realización, se llevan a cabo tres tratamientos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se realiza una etapa de precipitación en metanol de la heparina despolimerizada entre el primer y segundo tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y entre el segundo y tercer tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Preferiblemente, tras el primer tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la etapa d) la heparina despolimerizada se precipita en una solución de acetato sódico en metanol.

En una realización preferida, la HBPM obtenida en el procedimiento de la invención se purifica mediante precipitación con metanol.

La HBPM obtenida se puede someter a liofilización.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de HBPM obtenida mediante el procedimiento de la invención con ampliación de zona anomérica.

**Figura 2.** Espectro de  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  HSQC de HBPM obtenida mediante el procedimiento de la invención con ampliación de zona anomérica.

### EJEMPLOS

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.

#### Ejemplo 1

Se disuelven 10 g de heparina sódica en agua purificada y bajo agitación se añade una disolución de cloruro de benzalconio al 50 % (p/v), formándose el heparinato de benzalconio. El producto formado se lava varias veces con agua para eliminar el exceso de cloruros y finalmente el producto se seca por liofilización.

El heparinato de benzalconio se disuelve en cloruro de metileno y se ajusta la temperatura a  $30 \pm 5$  °C. Se añade hidróxido de benciltrimetilamonio (Triton B) al 40 % y se deja reaccionar a la temperatura anteriormente indicada. La adición se repite dos veces más.

A la disolución acuosa del producto despolimerizado, se añade  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33 % p/v, particularmente, a una concentración  $0,1 \pm 10\%$  litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por kg de heparinato de benzalconio y se deja reaccionar a  $30 \pm 5$  °C. Transcurrido el tiempo de reacción se precipita sobre una disolución de acetato sódico en metanol, aislándose por centrifugación la heparina de bajo peso molecular cruda.



Esta heparina de bajo peso molecular cruda se disuelve en agua y se precipita nuevamente con metanol. El precipitado se disuelve en agua purificada y se trata con  $\text{H}_2\text{O}_2$  33 % p/v, concretamente, a una concentración  $0,08 \pm 10\%$  litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$ / kg de heparinato de benzalconio a una temperatura de  $40 \pm 2$  °C. Tras el periodo de reacción, la solución se neutraliza y se precipita con metanol.

El precipitado se redisuelve en agua purificada y se trata de nuevo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  33% p/v a una temperatura de  $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Tras el periodo de reacción, la solución se neutraliza y se precipita con metanol.

El producto purificado se disuelve en agua y se liofiliza, obteniéndose 6,00 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3241 Da, una actividad anti-FXa de 118 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 13,7 UI/mg y presenta en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas un contenido de residuos 1,6-anhidro entre 1 y 15 % donde la proporción de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor o igual que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de otras heparinas de bajo peso molecular.

Esta heparina de bajo peso molecular además presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente durante 24-36 meses presentando un grado de color  $\geq 6$  medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur.(2.2.2, Método II)).

El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado era estable a temperatura ambiente en un intervalo entre 24 y 36 meses.

### **Ejemplo 2**

Partiendo de 10 g de heparina sódica y repitiendo los pasos indicados en el ejemplo 1, se obtienen 6,01 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3259 Da, una actividad anti-FXa de 103 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 15,2 UI/mg. Esta heparina de bajo peso molecular presenta la característica de tener en el extremo terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas un contenido de residuos 1,6-anhidro entre 1 y 15 % donde la proporción de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de otras heparinas de bajo peso molecular.

Esta heparina de bajo peso molecular además presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente durante 24-36 meses presentando un grado de color  $\geq 6$  medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur.(2.2.2, Método II)).

El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado era estable a temperatura ambiente en un intervalo entre 24 y 36 meses.

### **Ejemplo 3**

Se disuelven 10 g de heparina sódica en agua purificada y bajo agitación se añade una disolución de cloruro de benzalconio al 50% (p/v), formándose el heparinato de benzalconio. El producto formado se lava varias veces con agua para eliminar el exceso de cloruros y finalmente el producto se seca por liofilización.

El heparinato de benzalconio se disuelve en cloruro de metileno y se ajusta la temperatura a  $30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Se añade hidróxido de benciltrimetilamonio al 40% (Triton B) y se deja reaccionar a la temperatura anteriormente indicada. La adición se repite dos veces más.

A la disolución acuosa del producto despolimerizado, se añade  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33 % p/v, particularmente, a una concentración  $0,1 \pm 10\%$  litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$ / kg de heparinato de benzalconio y se deja reaccionar a  $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Trascurrido el tiempo de reacción se precipita sobre una disolución de acetato sódico en metanol, aislándose por centrifugación la heparina de bajo peso molecular cruda.

Esta heparina de bajo peso molecular cruda se disuelve en agua y se precipita nuevamente con metanol. El precipitado se disuelve en agua purificada y se trata con  $\text{H}_2\text{O}_2$  33 % p/v, concretamente, a una concentración  $0,08 \pm 10\%$  litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$ / kg de heparinato de benzalconio a una temperatura de  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Tras el periodo de reacción, la solución se neutraliza y se precipita con metanol.

El producto purificado se disuelve en agua y se liofiliza, obteniéndose 5,21 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3269 Da, una actividad anti-FXa de 119 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 13,70 UI/mg y presenta en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas un contenido de residuos 1,6-anhidro entre 1 y 15% donde la proporción de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor o equivalente que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de otras heparinas de bajo peso molecular.

Esta heparina de bajo peso molecular además presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente durante 24-36 meses presentando un grado de color  $\geq 6$  medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur.(2.2.2, Método II)).

El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado era estable a temperatura ambiente en un intervalo entre 24 y 36 meses.

**Ejemplo 4**

Partiendo de 10 g de heparina sódica y repitiendo los pasos indicados en el ejemplo 1, se obtienen 6,25 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3172 Da, una actividad anti-FXa de 108 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 13,1 UI/mg y un perfil de residuos 1,6-anhidro en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas entre 1 y 15 % donde la proporción de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor o equivalente que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de otras heparinas de bajo peso molecular, como la enoxaparina.

Esta heparina de bajo peso molecular además presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente durante 24-36 meses presentando un grado de color  $\geq 6$  medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur. (2.2.2, Método II)).

El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado era estable a temperatura ambiente en un intervalo entre 24 y 36 meses.

**Ejemplo 5**

Partiendo de 10 g de heparina sódica y repitiendo los pasos indicados en el ejemplo 1, se obtienen 6,34 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3347 Da, una actividad anti-FXa de 110 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 14,7 UI/mg y un perfil de residuos 1,6-anhidro en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas entre 1 y 15 % donde la proporción de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor o equivalente que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de otras heparinas de bajo peso molecular, como la enoxaparina.

Esta heparina de bajo peso molecular además presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente durante 24-36 meses presentando un grado de color  $\geq 6$  medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur. (2.2.2, Método II)). El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado era estable a temperatura ambiente en un intervalo entre 24 y 36 meses.

**Ejemplo 6**

Partiendo de 10 g de heparina sódica y repitiendo los pasos indicados en el ejemplo 1, se obtienen 7,11 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3400 Da, una actividad anti-FXa de 119 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 15,0 UI/mg y un perfil de residuos 1,6-anhidro en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas entre 1 y 15 % donde la proporción de los residuos 1,6-

anhidroglucosamina es mayor que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de otras heparinas de bajo peso molecular, como la enoxaparina.

Esta heparina de bajo peso molecular además presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente durante 24-36 meses presentando un grado de color  $\geq 6$  medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur. (2.2.2, Método II)). El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado era estable a temperatura ambiente en un intervalo entre 24 y 36 meses.

#### **Ejemplo 7**

Partiendo de 10 g de heparina sódica y repitiendo los pasos indicados en el ejemplo 1, se obtienen 6,92 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3328 Da, una actividad anti-FXa de 117 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 14,9 UI/mg y un perfil de residuos 1,6-anhidro en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas entre 1 y 15 % donde la proporción de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor o equivalente que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de otras heparinas de bajo peso molecular, como la enoxaparina.

Esta heparina de bajo peso molecular además presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente durante 24-36 meses presentando un grado de color  $\geq 6$  medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur. (2.2.2, Método II)). El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado era estable en un intervalo entre 24 y 36 meses.

#### **Ejemplo 8**

Partiendo de 10 g de heparina sódica y repitiendo los pasos indicados en el ejemplo 3, se obtienen 7,04 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3331 Da, una actividad anti-FXa de 113 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 15,3 UI/mg y un perfil de residuos 1,6-anhidro en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas entre 1 y 15 % donde la proporción de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor o equivalente que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de otras heparinas de bajo peso molecular, como la enoxaparina.

Esta heparina de bajo peso molecular además presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente durante 24-36 meses presentando un grado de color  $\geq 6$  medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur.(2.2.2, Método II)). El grado de color,

parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado era estable a temperatura ambiente en un intervalo entre 24 y 36 meses.

#### **Ejemplo 9**

Partiendo de 10 g de heparina sódica y repitiendo los pasos indicados en el ejemplo 3, se obtienen 7,09 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3366 Da, una actividad anti-FXa de 115 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 16,0 UI/mg y un perfil de residuos 1,6-anhidro en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas entre 1 y 15 % donde la proporción de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor o equivalente que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de otras heparinas de bajo peso molecular, como la enoxaparina.

Esta heparina de bajo peso molecular además presenta la ventaja de ser estable a temperatura ambiente durante 24-36 meses presentando un grado de color  $\geq 6$  medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur.(2.2.2, Método II)). El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado era estable a temperatura ambiente en un intervalo entre 24 y 36 meses.

#### **Ejemplo comparativo 10 (sin tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Se disuelven 10 g de heparina sódica en agua purificada y bajo agitación se añade una disolución de cloruro de benzalconio al 50 % (p/v), formándose el heparinato de benzalconio. El producto formado se lava varias veces con agua para eliminar el exceso de cloruros y finalmente el producto se seca por liofilización.

El heparinato de benzalconio se disuelve en cloruro de metileno y se ajusta la temperatura a  $30 \pm 5$  °C. Se añade hidróxido de benciltrimetilamonio al 40 % (Triton B) y se deja reaccionar a la temperatura anteriormente indicada. La adición se repite dos veces más.

La solución del producto despolimerizado se precipita sobre una disolución de acetato sódico en metanol, aislándose por centrifugación la heparina de bajo peso molecular cruda.

Esta heparina de bajo peso molecular cruda se disuelve en agua y se precipita nuevamente con metanol. El precipitado se disuelve en agua purificada a una temperatura de  $40 \pm 2$  °C a pH 11. Trascorridas 5 horas, la solución se neutraliza y se precipita con metanol.

El producto purificado se disuelve en agua y se liofiliza, obteniéndose 5,28 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 3280 Da, una actividad anti-FXa

de 112 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 13,70 UI/mg y presenta en el terminal reductor de sus cadenas oligosacarídicas un contenido de residuos 1,6-anhidro de 18,5 %.

Además, se analiza la proporción de residuos 1,6-anhidroglucosamina respecto de la de los residuos 1,6 anhidromanosamina, a diferencia de los ejemplos anteriores, los restos 1,6 anhidromanosamina son mayores que los de 1,6-anhidroglucosamina.

Se analiza además el grado de estabilidad correlacionado con el color de la muestra, observando que a partir del décimo mes a temperatura ambiente presenta un grado de color de 4 medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur. (2.2.2, Método II)).

El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado no era estable durante más de 9 meses a temperatura ambiente, por lo que las adiciones de  $H_2O_2$ , parecen ser las responsables de este comportamiento.

#### **Ejemplo comparativo 11 (despolimerización a 60°C)**

Se disuelven 10 g de heparina sódica en agua purificada y bajo agitación se añade una disolución de cloruro de benzalconio al 50 % (p/v), formándose el heparinato de benzalconio. El producto formado se lava varias veces con agua para eliminar el exceso de cloruros y finalmente el producto se seca por liofilización.

El heparinato de benzalconio se disuelve en cloruro de metileno y se ajusta la temperatura a  $60 \pm 5$  °C. Se añade hidróxido de benciltrimetilamonio al 40 % (Triton B) y se deja reaccionar a la temperatura anteriormente indicada. La adición se repite dos veces más.

A la disolución acuosa del producto despolimerizado, se añade peróxido de hidrógeno al 33 % p/v, particularmente, a una concentración  $0,1 \pm 10\%$  litros de  $H_2O_2$ /kg de heparinato de benzalconio y se deja reaccionar a  $30 \pm 5$  °C. Transcurrido el tiempo de reacción se precipita sobre una disolución de acetato sódico en metanol, aislándose por centrifugación la heparina de bajo peso molecular cruda.

Esta heparina de bajo peso molecular cruda se disuelve en agua y se precipita nuevamente con metanol. El precipitado se disuelve en agua purificada y se trata con peróxido de hidrógeno 33 % p/v, concretamente, a una concentración  $0,08 \pm 10\%$  litros de  $H_2O_2$  por kg de heparinato de benzalconio a una temperatura de  $40 \pm 2$  °C. Tras el periodo de reacción, la solución se neutraliza y se precipita con metanol.

El precipitado se redissuelve en agua purificada y se trata de nuevo con peróxido de hidrógeno 33 % p/v a una temperatura de  $40 \pm 2$  °C. Tras el periodo de reacción, la solución se neutraliza y se precipita con metanol.

El producto purificado se disuelve en agua y se liofiliza, obteniéndose 5,10 g de heparina de bajo peso molecular y un peso molecular medio de 2341 Da, una actividad anti-FXa de 109 UI/mg y una actividad anti-FIIa de 2,8 UI/mg y presenta en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas un contenido de residuos 1,6-anhidro de 21 % donde la proporción de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mucho menor que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina.

Se analiza además el grado de estabilidad correlacionado con el color de la muestra, observando que a partir del décimo mes a temperatura ambiente presenta un grado de color de 4 medido con un colorímetro de la marca LICO® que relaciona el color según la gama cromática de referencia establecida en Farmacopea (Ph. Eur. (2.2.2, Método II)).

El grado de color, parámetro directamente relacionado con la estabilidad del producto, permitió determinar que el producto final envasado no era estable durante más de 10-11 meses a temperatura ambiente, requiriendo cadena de frío para que la estabilidad del producto supere los 12 meses.

### Ejemplo 12

Los productos obtenidos en los ejemplos 1 a 11 se analizan para determinar porcentualmente el contenido en residuos 1,6-anhidro de manera concreta, de acuerdo con el método descrito en el documento Enoxaparin Sodium monograph, 1097, European Pharmacopeia 9th Ed, descrito en el apartado Identificación B, obteniéndose los siguientes resultados.

| Ejemplo | Peso molecular medio, Da | Contenido 1,6-anhidro, % |
|---------|--------------------------|--------------------------|
| 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                       |

### Ejemplo 13

El producto obtenido en el ejemplo 1, se analiza por resonancia magnética nuclear, en concreto por los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC.

La espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN ha sido la técnica más ampliamente usada para el estudio de estos compuestos dado que se trata de un núcleo abundante y con una alta relación giromagnética. La región entre 1,8 - 2,1 ppm comprende las señales correspondientes a los grupos N-acetilo o los grupos metilos de los terminales reductores que pueden ser incluidos sintéticamente. La región entre 2,8 – 4,6 ppm, comprende la mayoría de las señales del anillo sacarídico y presentan un alto grado de solapamiento entre ellas, lo que hace que sea dificultoso extraer información estructural directamente de esta zona. Entre 4,6 - 6,0 ppm se encuentran las señales correspondientes a los protones anoméricos. Dada que es una zona mucho menos poblada de señales, es posible extraer una gran información de ella. Además, en el caso de HBPMs obtenidas por mecanismo de  $\beta$ -eliminación, también contienen las señales correspondientes a los H4 de los terminales no reductores de la molécula.

En concreto las señales correspondientes a los residuos 1,6-anhidro aparecen a 5,57 y 5,62 ppm, que corresponden al protón anomérico de las estructuras de 1,6-anhidromanosamina y 1,6-anhidroglucosamina, respectivamente, y tal como describe la literatura.

Otro experimento bidimensional de particular importancia para la caracterización estructural de este tipo de compuestos, es el  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation), que correlaciona desplazamientos químicos de protón con desplazamientos químicos de carbono 13, y permite asignar las estructuras primarias de oligosacáridos derivados de GAGs y la composición monosacáridica.

El incremento de dispersión espectral conseguida con esta técnica bidimensional permite la cuantificación de las integrales de las señales que se superponen en los correspondientes espectros monodimensionales.

Las señales correspondientes a los residuos 1,6-anhidro aparecen a 5,57-103,9 y 5,61-104,3 ppm, que corresponden al protón anomérico de las estructuras de 1,6-anhidromanosamina y 1,6-anhidroglucosamina, respectivamente, y tal como describe la literatura y así se observa en las figuras 1 y 2 para la muestra del producto obtenido en el ejemplo 1.

#### **Ejemplo 14**

Los productos obtenidos en los ejemplos 1 a 10, se analizaron para determinar el contenido en residuos de 2-sulfo-amino-1,6-anhidro-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa (1,6-anhidroglucosamina ó 1,6-an.A) y 2-sulfo-amino-1,6-anhidro-2-desoxi- $\beta$ -D-manopiranososa (1,6-anhidromanosamina ó 1,6-an.M), de acuerdo al procedimiento



conocido en el estado de la técnica para los experimentos de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, obteniéndose los siguientes resultados.

| Ejemplo | 1,6-an.A, % mol.<br>(proporción<br>relativa) | 1,6-an.M, % mol.<br>(proporción<br>relativa) | Ratio 1,6-an.A /<br>1,6-an.M |
|---------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------|
| 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                         |

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de heparinas de bajo peso molecular con un peso molecular medio de entre 3 y 3,8 KDa que comprende las siguientes etapas:
  - a) preparar una solución acuosa de heparina sódica;
  - b) añadir cloruro de benzalconio a la solución de la etapa (a) para obtener heparinato de benzalconio;
  - c) disolver el heparinato de benzalconio obtenido en la etapa (b) en  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ , añadir Triton B y mantener una temperatura de entre 20 y 40°C durante entre 24 y 48 horas; y
  - d) realizar al menos dos tratamientos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  de la heparina despolimerizada obtenida tras la etapa c) en una razón de entre 0,04 y 1,0 litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada, en cada tratamiento.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la adición de Triton B de la etapa (c) se hace en un máximo de tres adiciones secuenciales, cada una de ellas con la adición de Triton B en una razón en peso de 0,2:1 a 0,3:1 de Triton B:heparinato de benzalconio.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la temperatura de la etapa (c) es de entre 25 y 35 °C, preferiblemente entre 27 y 32 °C.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la etapa (c) comprende tres adiciones secuenciales de Triton B, de forma que tras la primera adición se mantiene la reacción durante 6-10 horas hasta la segunda adición, tras la segunda adición se mantiene la reacción durante 12-20 horas hasta la tercera adición, y tras la tercera adición se mantiene la reacción durante 6-10 horas.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde cada tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la etapa d) se realiza con una razón de entre 0,04 y 0,5 litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada, preferiblemente entre 0,04 y 0,3 litros de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la etapa (d) se lleva a cabo a una temperatura de entre 20 y 50 °C, preferiblemente entre 25 y 45 °C.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la etapa (d) se lleva a cabo a un pH entre 10,5 y 11,5 y preferiblemente durante al menos 3 horas cada tratamiento con  $H_2O_2$ .
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la etapa d) comprende un primer tratamiento con  $H_2O_2$  de la heparina despolimerizada obtenida tras la etapa c) en una razón de entre 0,05 y 0,25 litros de  $H_2O_2$  al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada, y un segundo tratamiento con  $H_2O_2$  en una razón de entre 0,04 y 0,25 litros de  $H_2O_2$  al 33 % p/v por cada kg de heparina despolimerizada.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la heparina despolimerizada se precipita en metanol entre cada etapa de tratamiento con  $H_2O_2$ .
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la heparina de bajo peso molecular obtenida se purifica por precipitación con metanol.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la heparina de bajo peso molecular obtenida se somete a liofilización.
12. Heparina de bajo peso molecular con un peso molecular medio de entre 3 y 3,8 KDa, obtenida mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Heparina de bajo peso molecular según la reivindicación 12 caracterizada porque presenta en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas un contenido de residuos 1,6-anhidro de entre 1 y 15 %, preferiblemente entre 4 y 11 %.
14. Heparina de bajo peso molecular según una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, donde la proporción molar de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor o igual que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina.
15. Heparina de bajo peso molecular según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizada porque presenta una actividad anti-FXa de entre 80-120 UI/mg y una actividad anti-FIIa de entre 5-20 UI/mg.

16. Heparina de bajo peso molecular según una cualquiera de las reivindicaciones a 12 a 15, donde dicha heparina presenta un grado de color mayor o igual a 6 en la gama de soluciones de referencia del color establecidas en Farmacopea Europea 2.2.2. método II, durante al menos 24 meses, preferiblemente durante al menos 36 meses, a temperatura ambiente.

17. Heparina de bajo peso molecular con un peso molecular medio de entre 3 y 3,8 KDa, caracterizada porque presenta en el terminal reductor de sus cadenas oligosacáridicas un contenido de residuos 1,6-anhidro de entre 1 y 15 %, preferiblemente entre 4 y 11 %.

18. Heparina de bajo peso molecular según la reivindicación 17, donde la proporción molar de los residuos 1,6-anhidroglucosamina es mayor o igual que la de los residuos 1,6 anhidromanosamina.

19. Heparina de bajo peso molecular según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18, caracterizada porque presenta una actividad anti-FXa de entre 80-120 UI/mg y una actividad anti-FIIa de entre 5-20 UI/mg.

20. Heparina de bajo peso molecular según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, donde dicha heparina presenta un grado de color mayor o igual a 6 en la gama de soluciones de referencia del color establecidas en Farmacopea Europea 2.2.2. método II, durante al menos 24 meses, preferiblemente durante al menos 36 meses, a temperatura ambiente.

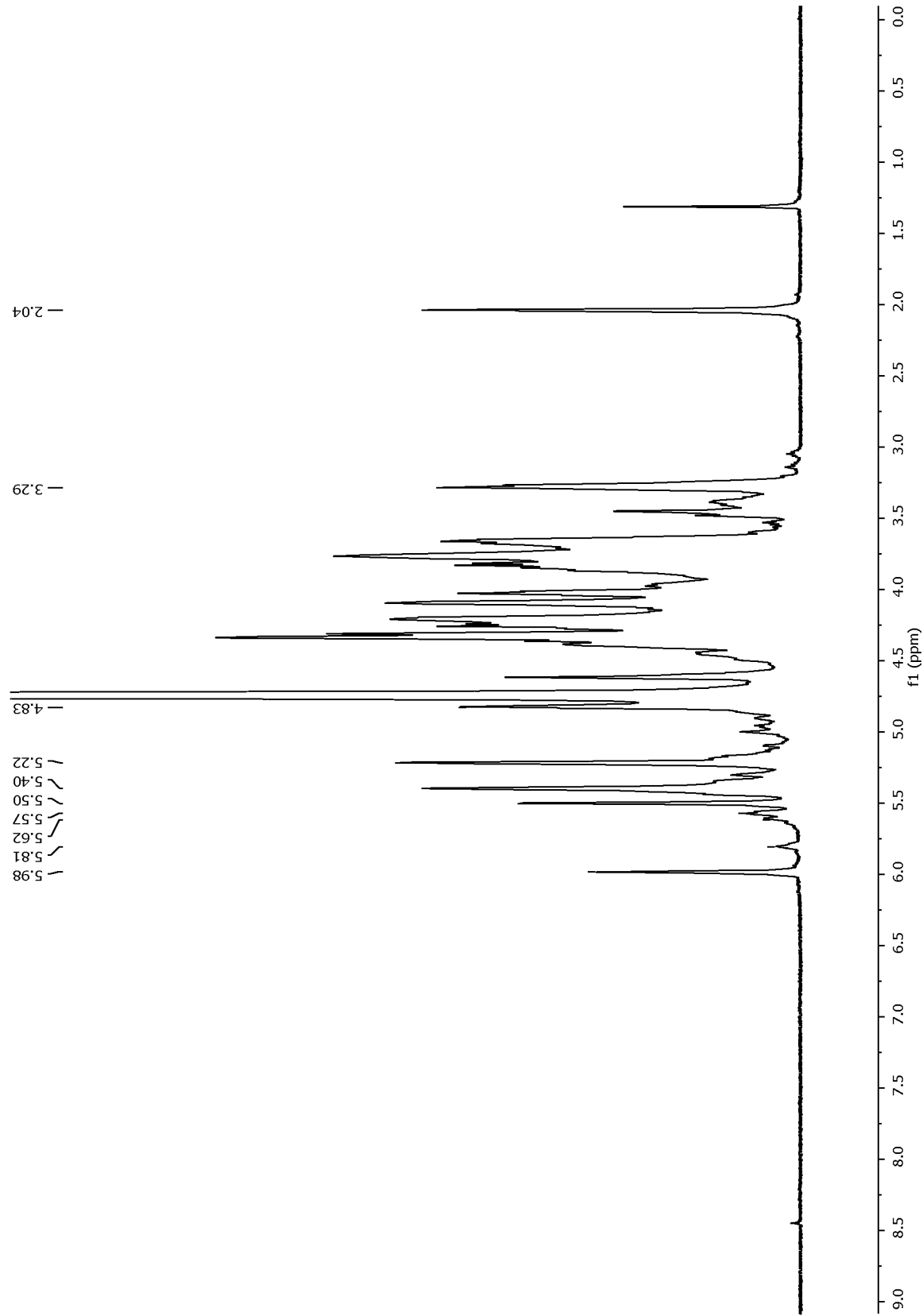


FIG.1

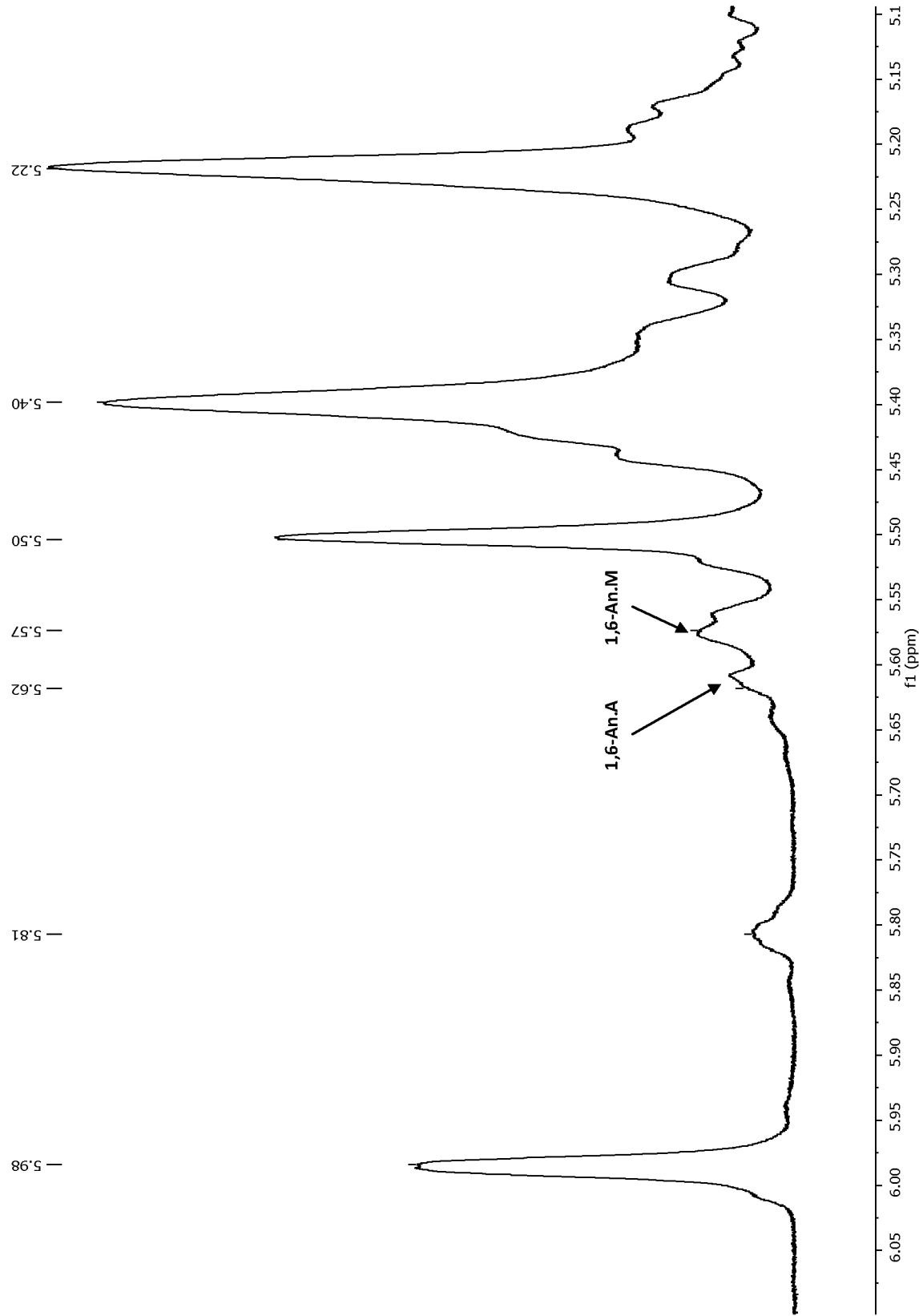


FIG. 1 CONT.

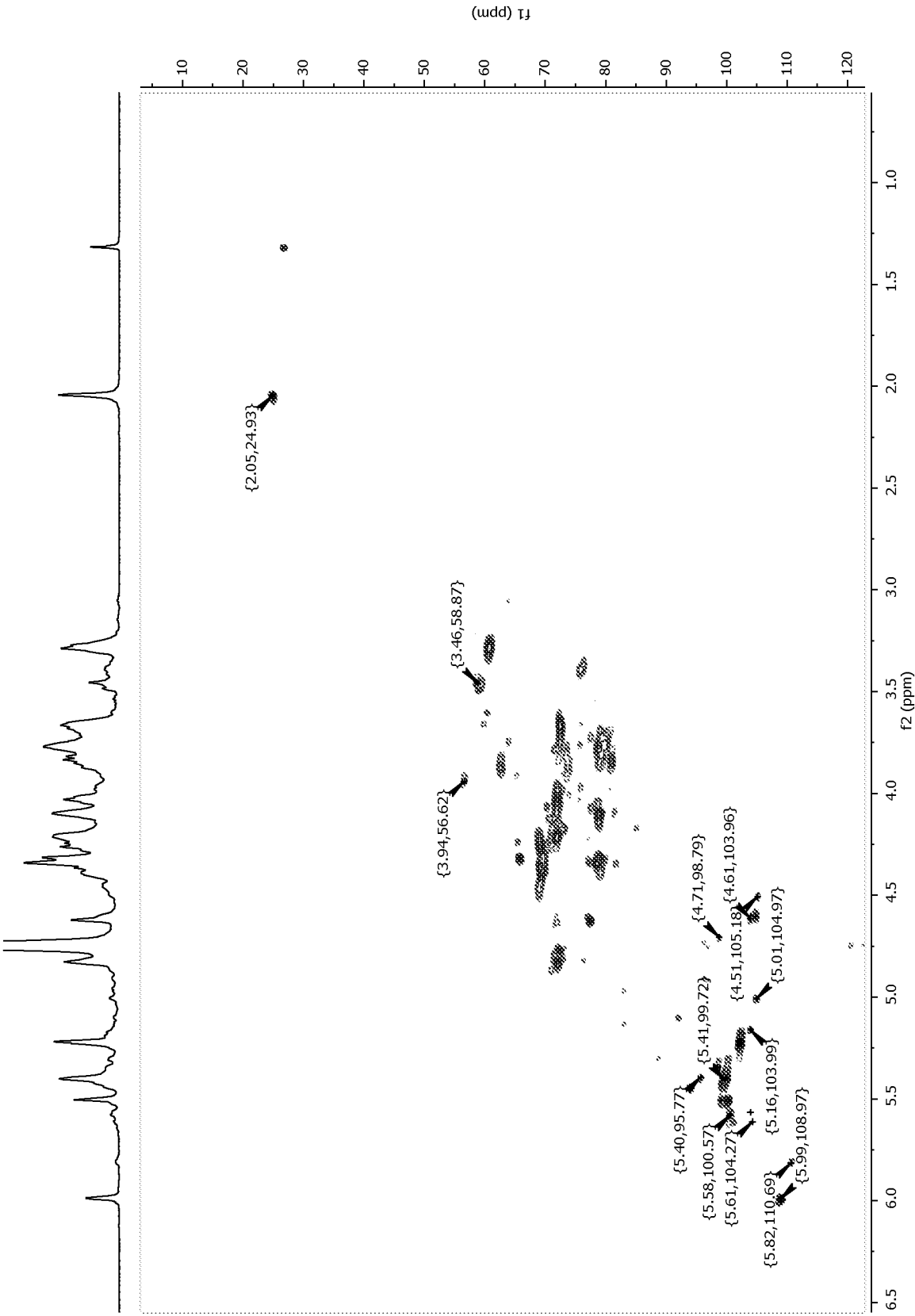


FIG. 2

4/4

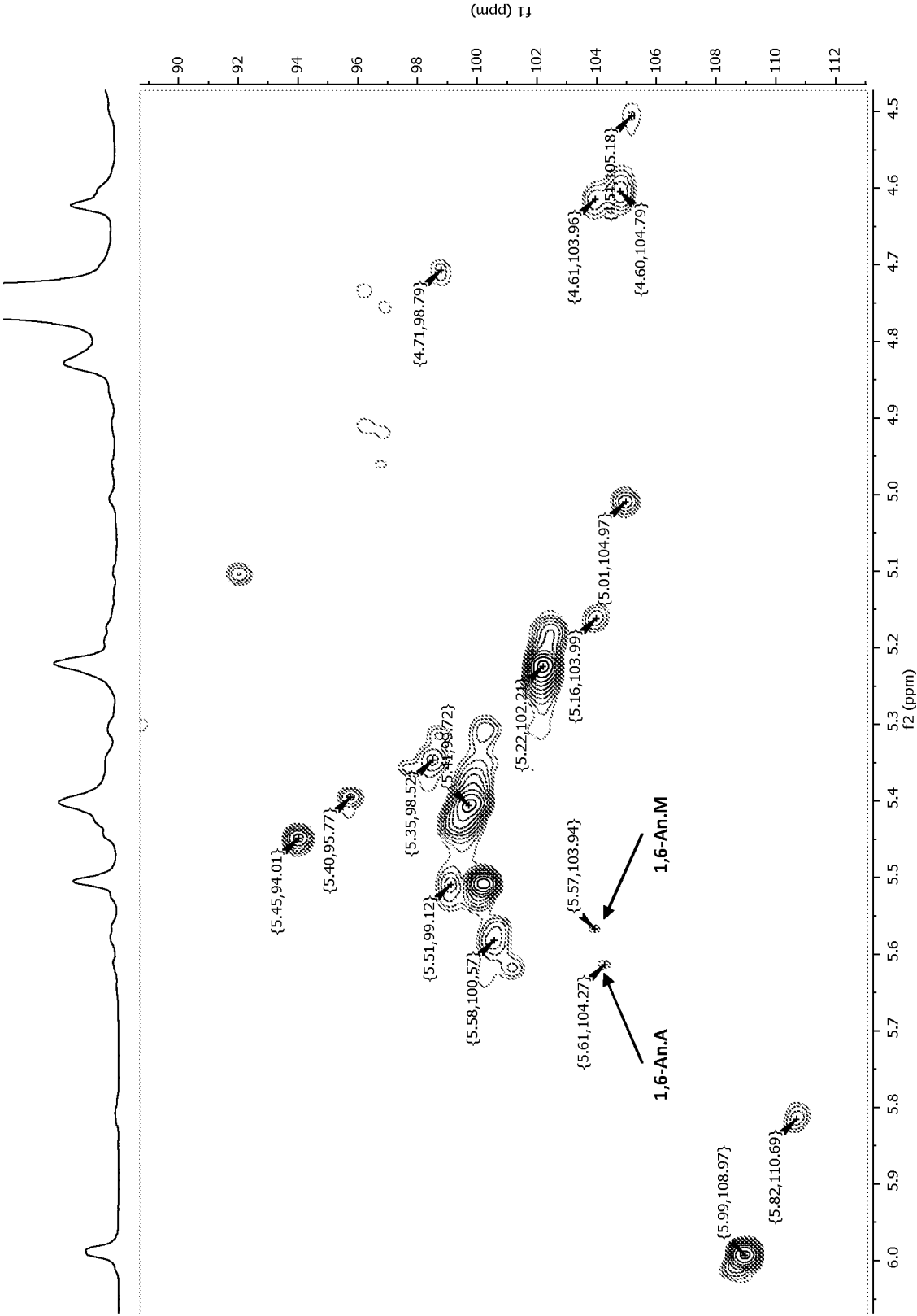


FIG. 2 CONT.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070271

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C08B37/10** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C08B**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, y Bases de Datos TXT

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                   | Relevant to claim No.                      |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| X<br>Y    | ES 2161615 A1 (ROVI LAB FARMACEUT SA) 01/12/2001,<br>example 1 and claims 4 and 5                                    | 12, 15, 17, 19<br>1-11, 13, 14, 16, 18, 20 |
| Y         | CN 102399379 A (SHANGHAI SEANPHARM CO LTD) 04/04/2012,<br>description and example 5                                  | 1-11, 13, 14, 16, 18, 20                   |
| A         | EP 0040144 A1 (PHARMUKA LAB) 18/11/1981,<br>the whole document.                                                      | 1-20                                       |
| A         | ES 2003197 A6 (ROVI LAB FARMACEUT SA) 16/10/1988,<br>the whole document.                                             | 1-20                                       |
| A         | EP 2881404 A1 (FARMACÉUTICOS ROVI S A<br>LAB LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ROVI S A) 10/06/2015,<br>the whole document. | 1-20                                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                         |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                                                               |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.                                                                                           | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                               |

Date of the actual completion of the international search  
**24/06/2020**

Date of mailing of the international search report  
**(25/06/2020)**

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. García Coca

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493411

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070271

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                      |                       |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                            | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
| A                                                     | LINHARDT ROBERT J et al.. "Production and chemical processing of low molecular weight heparins".<br>Seminars In Thrombosis And Hemostasis 1999., 30/11/1998,<br>Vol. 25, N° SUPPL. 3, pages 5-16, ISSN 0094-6176 the whole document. | 1-20                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070271

## Information on patent family members

| Patent document cited<br>in the search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Publication<br>date                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ES2003197 A6                                  | 16.10.1988          | EP0293539 A2<br>EP0293539 A3<br>DE3750036T T2<br>AT106901T T                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 07.12.1988<br>12.04.1989<br>26.01.1995<br>15.06.1994                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| -----                                         | -----               | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| CN102399379 A                                 | 04.04.2012          | CN102399379B B                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 31.08.2016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| -----                                         | -----               | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| EP0040144 A1                                  | 18.11.1981          | ZA8103176 B<br>PT73024 A<br>PT73024 B<br>NZ197081 A<br>NO156129B B<br>NO156129C C<br>MX6537E E<br>MA19143 A1<br>KR830006333 A<br>KR840001753B B1<br>JPS5710601 A<br>JPS6051482B B2<br>IN152828 B<br>IL62866 A<br>IE51283 B1<br>IE811074L L<br>HUT34769 A<br>HU188667 B<br>GR82283 B<br>FR2482611 A1<br>FR2482611 B1<br>FI67865B B<br>FI67865C C<br>ES8206555 A1<br>DZ294 A1<br>DK211981 A<br>DK168824B B1<br>CA1181744 A<br>AU7051981 A<br>AU535791B B2<br>ATA213681 A<br>AT384428B B<br>AR229510 A1 | 26.05.1982<br>01.06.1981<br>01.07.1982<br>31.07.1984<br>16.11.1981<br>29.07.1987<br>04.07.1985<br>31.12.1981<br>24.09.1983<br>19.10.1984<br>20.01.1982<br>14.11.1985<br>14.04.1984<br>29.06.1984<br>14.11.1981<br>14.11.1981<br>28.04.1985<br>28.05.1986<br>13.12.1984<br>20.11.1981<br>07.03.1986<br>15.11.1981<br>10.06.1985<br>16.08.1982<br>13.09.2004<br>15.11.1981<br>20.06.1994<br>29.01.1985<br>19.11.1981<br>05.04.1984<br>15.04.1987<br>10.11.1987<br>15.09.1983 |
| -----                                         | -----               | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| ES2161615 A1                                  | 01.12.2001          | US6384021 B1<br>PT1070503E E<br>JP2001187802 A<br>JP4897991B B2<br>ES2244165T T3<br>EP1070503 A1<br>EP1070503 B1<br>DK1070503T T3<br>DE69925821T T2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 07.05.2002<br>31.10.2005<br>10.07.2001<br>14.03.2012<br>01.12.2005<br>24.01.2001<br>15.06.2005<br>05.12.2005<br>18.05.2006                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070271

## Information on patent family members

| Patent document cited<br>in the search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-----------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
|                                               |                     | BR9905820 A                | 13.03.2001          |
|                                               |                     | AT309693T T                | 15.07.2005          |
| -----                                         | -----               | -----                      | -----               |
| CN102816255 A                                 | 12.12.2012          | CN102816255B B             | 25.11.2015          |
| -----                                         | -----               | -----                      | -----               |
| EP2881404 A1                                  | 10.06.2015          | CY1120872T T1              | 11.12.2019          |
|                                               |                     | SI2881404T T1              | 30.10.2018          |
|                                               |                     | PL2881404T T3              | 31.08.2018          |
|                                               |                     | HUE037251T T2              | 28.08.2018          |
|                                               |                     | LT2881404T T               | 10.08.2018          |
|                                               |                     | HRP20180777T T1            | 10.08.2018          |
|                                               |                     | PT2881404T T               | 23.05.2018          |
|                                               |                     | DK2881404T T3              | 06.06.2018          |
|                                               |                     | CN108102007 A              | 01.06.2018          |
|                                               |                     | ES2669727T T3              | 29.05.2018          |
|                                               |                     | BR112015002358             | 04.07.2017          |
|                                               |                     | A2                         | 31.12.2015          |
|                                               |                     | HK1206042 A1               | 04.09.2015          |
|                                               |                     | IN435MUMNP2015             | 13.08.2015          |
|                                               |                     | A                          | 20.03.2018          |
|                                               |                     | JP2015523451 A             | 08.04.2015          |
|                                               |                     | JP6298052B B2              | 03.03.2014          |
|                                               |                     | CN104507972 A              | 06.03.2015          |
|                                               |                     | ES2445494 A1               | 06.02.2014          |
| -----                                         | -----               | ES2445494 B1               | -----               |
|                                               |                     | WO2014020227 A1            |                     |
|                                               |                     | -----                      |                     |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2020/070271

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **C08B37/10** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
**C08B**

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

**EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, y Bases de Datos TXT**

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                      | Relevante para las reivindicaciones nº     |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| X<br>Y     | ES 2161615 A1 (ROVI LAB FARMACEUT SA) 01/12/2001, ejemplo 1 y reivindicaciones 4 y 5                          | 12, 15, 17, 19<br>1-11, 13, 14, 16, 18, 20 |
| Y          | CN 102399379 A (SHANGHAI SEANPHARM CO LTD) 04/04/2012, descripción y ejemplo 5                                | 1-11, 13, 14, 16, 18, 20                   |
| A          | EP 0040144 A1 (PHARMUKA LAB) 18/11/1981, Todo el documento.                                                   | 1-20                                       |
| A          | ES 2003197 A6 (ROVI LAB FARMACEUT SA) 16/10/1988, Todo el documento.                                          | 1-20                                       |
| A          | EP 2881404 A1 (FARMACÉUTICOS ROVI S A LAB LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ROVI S A) 10/06/2015, todo el documento. | 1-20                                       |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

|                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**24/06/2020**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**25 de junio de 2020 (25/06/2020)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
**OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS**  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
**M. García Coca**  
Nº de teléfono 91 3493411

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070271

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                       |                                        |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría *                                          | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                              | Relevante para las reivindicaciones nº |
| A                                                    | LINHARDT ROBERT J et al.. "Production and chemical processing of low molecular weight heparins".<br>Seminars In Thrombosis And Hemostasis 1999., 30/11/1998,<br>Vol. 25, Nº SUPPL. 3, páginas 5-16, ISSN 0094-6176 todo el documento. | 1-20                                   |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070271

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de Publicación | Miembro(s) de la familia de patentes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Fecha de Publicación                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ES2003197 A6                                          | 16.10.1988           | EP0293539 A2<br>EP0293539 A3<br>DE3750036T T2<br>AT106901T T                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 07.12.1988<br>12.04.1989<br>26.01.1995<br>15.06.1994                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| -----                                                 | -----                | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| CN102399379 A                                         | 04.04.2012           | CN102399379B B                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 31.08.2016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| -----                                                 | -----                | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| EP0040144 A1                                          | 18.11.1981           | ZA8103176 B<br>PT73024 A<br>PT73024 B<br>NZ197081 A<br>NO156129B B<br>NO156129C C<br>MX6537E E<br>MA19143 A1<br>KR830006333 A<br>KR840001753B B1<br>JPS5710601 A<br>JPS6051482B B2<br>IN152828 B<br>IL62866 A<br>IE51283 B1<br>IE811074L L<br>HUT34769 A<br>HU188667 B<br>GR82283 B<br>FR2482611 A1<br>FR2482611 B1<br>FI67865B B<br>FI67865C C<br>ES8206555 A1<br>DZ294 A1<br>DK211981 A<br>DK168824B B1<br>CA1181744 A<br>AU7051981 A<br>AU535791B B2<br>ATA213681 A<br>AT384428B B<br>AR229510 A1 | 26.05.1982<br>01.06.1981<br>01.07.1982<br>31.07.1984<br>16.11.1981<br>29.07.1987<br>04.07.1985<br>31.12.1981<br>24.09.1983<br>19.10.1984<br>20.01.1982<br>14.11.1985<br>14.04.1984<br>29.06.1984<br>14.11.1981<br>14.11.1981<br>28.04.1985<br>28.05.1986<br>13.12.1984<br>20.11.1981<br>07.03.1986<br>15.11.1981<br>10.06.1985<br>16.08.1982<br>13.09.2004<br>15.11.1981<br>20.06.1994<br>29.01.1985<br>19.11.1981<br>05.04.1984<br>15.04.1987<br>10.11.1987<br>15.09.1983 |
| -----                                                 | -----                | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| ES2161615 A1                                          | 01.12.2001           | US6384021 B1<br>PT1070503E E<br>JP2001187802 A<br>JP4897991B B2<br>ES2244165T T3<br>EP1070503 A1<br>EP1070503 B1<br>DK1070503T T3<br>DE69925821T T2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 07.05.2002<br>31.10.2005<br>10.07.2001<br>14.03.2012<br>01.12.2005<br>24.01.2001<br>15.06.2005<br>05.12.2005<br>18.05.2006                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070271

| Documento de patente citado<br>en el informe de búsqueda | Fecha de<br>Publicación | Miembro(s) de la<br>familia de patentes | Fecha de<br>Publicación |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
|                                                          |                         | BR9905820 A                             | 13.03.2001              |
|                                                          |                         | AT309693T T                             | 15.07.2005              |
| -----                                                    | -----                   | -----                                   | -----                   |
| CN102816255 A                                            | 12.12.2012              | CN102816255B B                          | 25.11.2015              |
| -----                                                    | -----                   | -----                                   | -----                   |
| EP2881404 A1                                             | 10.06.2015              | CY1120872T T1                           | 11.12.2019              |
|                                                          |                         | SI2881404T T1                           | 30.10.2018              |
|                                                          |                         | PL2881404T T3                           | 31.08.2018              |
|                                                          |                         | HUE037251T T2                           | 28.08.2018              |
|                                                          |                         | LT2881404T T                            | 10.08.2018              |
|                                                          |                         | HRP20180777T T1                         | 10.08.2018              |
|                                                          |                         | PT2881404T T                            | 23.05.2018              |
|                                                          |                         | DK2881404T T3                           | 06.06.2018              |
|                                                          |                         | CN108102007 A                           | 01.06.2018              |
|                                                          |                         | ES2669727T T3                           | 29.05.2018              |
|                                                          |                         | BR112015002358                          | 04.07.2017              |
|                                                          |                         | A2                                      | 31.12.2015              |
|                                                          |                         | HK1206042 A1                            | 04.09.2015              |
|                                                          |                         | IN435MUMNP2015                          | 13.08.2015              |
|                                                          |                         | A                                       | 20.03.2018              |
|                                                          |                         | JP2015523451 A                          | 08.04.2015              |
|                                                          |                         | JP6298052B B2                           | 03.03.2014              |
|                                                          |                         | CN104507972 A                           | 06.03.2015              |
|                                                          |                         | ES2445494 A1                            | 06.02.2014              |
| -----                                                    | -----                   | ES2445494 B1                            | -----                   |
|                                                          |                         | WO2014020227 A1                         |                         |
|                                                          |                         | -----                                   |                         |