

(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 2012/035188 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
22 de marzo de 2012 (22.03.2012)

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C07B 45/02 (2006.01) C07H 5/04 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2011/070645
- (22) Fecha de presentación internacional:  
15 de septiembre de 2011 (15.09.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P201031374  
15 de septiembre de 2010 (15.09.2010) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **DE PAZ CARRERA, José Luis** [ES/ES]; Instituto de Investigaciones Químicas, Américo Vespucio, s/n, Isla de la Cartuja, E-41092 Sevilla (ES). **NIETO MESA, Pedro Manuel** [ES/ES]; Instituto de Investigaciones Químicas, Américo Vespucio, s/n, Isla de la Cartuja, E-41092 Sevilla (ES). **MAZA PÉREZ, Susana** [ES/ES]; Instituto de Investigaciones Químicas, Américo Vespucio, s/n, Isla de la Cartuja, E-41092 Sevilla (ES).
- (74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: METHOD FOR THE SULFATION OF OLIGOSACCHARIDES BY MEANS OF MICROWAVE HEATING

(54) Título : PROCEDIMIENTO DE SULFATACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS POR CALENTAMIENTO CON MICROONDAS

(57) Abstract: The invention relates to a method for the O-sulfation of oligosaccharides precursors to synthetic heparin, including microwave heating which reduces reaction times.

(57) Resumen: La presente invención describe un procedimiento de O-sulfatación de oligosacáridos precursores de heparina sintética, en el que se realiza un calentamiento por microondas que reduce los tiempos de reacción.



WO 2012/035188 A1

## **PROCEDIMIENTO DE SULFATACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS POR CALENTAMIENTO CON MICROONDAS**

La presente invención describe un procedimiento de O-sulfatación de oligosacáridos precursores de heparina sintética, en el que se realiza un calentamiento por microondas que reduce los tiempos de reacción. Por tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la síntesis química.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

10

La heparina es un polisacárido altamente sulfatado y heterogéneo que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos (GAGs) y participa en una amplia variedad de procesos biológicos. La estructura de la heparina está constituida por la repetición de unidades disacarídicas de d-glucosamina y ácido l-idurónico o d-glucurónico, unidas mediante enlaces 1→4. Este disacárido puede contener grupos O-sulfato en las posiciones 3 y 6 de la unidad de glucosamina y en la posición 2 del ácido urónico. Además, el nitrógeno de la unidad de glucosamina puede encontrarse sulfatado, acetilado o como grupo amino libre. Esta variedad estructural de la heparina, particularmente en el patrón de sulfatación, es la responsable de su interacción específica con una amplia gama de proteínas.

La síntesis química ha sido ampliamente utilizada para obtener oligosacáridos de heparina con estructura definida, etapa necesaria para determinar relaciones estructura-actividad para secuencias específicas de este polisacárido (Arungundram, S.; Al-Mafraji, K.; Asong, J.; Leach, F. E.; Amster, I. J.; Venot, A.; Turnbull, J. E.; Boons, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 17394-17405). Sin embargo, la síntesis de estos productos sigue siendo un proceso extremadamente complejo. El método tradicional consiste en la síntesis del oligosacárido protegido, seguida de desprotección de los grupos hidroxilos que van a ser sulfatados, sulfatación de los mismos y desprotección del resto de la molécula. En muchos casos, el tiempo empleado en estas etapas de

desprotección/sulfatación es mayor que el necesario para la síntesis del oligosacárido protegido. Además, suelen obtenerse rendimientos bajos o moderados para estas etapas finales, particularmente para la sulfatación, que se realizan sobre compuestos muy elaborados y, por tanto, muy valiosos.

5

La *O*-sulfatación de los grupos hidroxilos de precursores sintéticos de oligosacáridos de heparina, se realiza normalmente utilizando un complejo de trióxido de azufre, como  $\text{SO}_3\cdot\text{NEt}_3$  o  $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$ , DMF como disolvente y calentando a 50-60°C. De forma alternativa, se ha empleado el complejo

10  $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$  y piridina (Py) como disolvente. Para oligosacáridos con un gran número de grupos hidroxilo se requiere un gran exceso del complejo de trióxido de azufre y tiempos de reacción muy largos, incluso de varios días. En algunos casos, aún utilizando condiciones de reacción extremas, se obtienen rendimientos moderados debido a que la reacción no se completa y se

15 detectan numerosos productos de sulfataciones parciales (de Paz, J. L.; Martín-Lomas, M. *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 1849-1858). Esto conlleva la realización de varios ciclos de reacción, utilizando excesos de complejo de sulfatación y purificando los crudos de productos parcialmente sulfatados en cada ciclo. Las diferencias de rendimientos y tiempos de reacción que se encuentran en la

20 bibliografía pueden atribuirse a la distinta distribución de grupos protectores y/o a la procedencia del agente sulfatante. Es de destacar que la inestabilidad de los oligosacáridos de heparina altamente sulfatados conlleva ciertas limitaciones en el uso de altas temperaturas durante prolongados tiempos de reacción.

25

Por lo tanto, son necesarios métodos más rápidos y eficientes para la preparación de oligosacáridos de heparina altamente sulfatados. En los últimos años, la radiación con microondas ha sido ampliamente utilizada en síntesis química (Kappe, C. O.; Dallinger, D. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, 5, 51-63).

30 Una de las principales ventajas que presenta la síntesis asistida por microondas es la reducción espectacular de los tiempos de reacción, que pasan de días y horas, a minutos y segundos. Estas mejoras inducidas por la

radiación microondas parece que se obtienen en reacciones donde estén involucradas moléculas cargadas y disolventes polares. Por tanto, la reacción de sulfatación es especialmente apropiada para utilizar radiación microondas. Sin embargo, sorprende que las sulfataciones asistidas por microondas hayan recibido muy poca atención en el sector. Hasta el momento, la radiación microondas no ha sido utilizada para la síntesis de GAGs sulfatados, incluidos los oligosacáridos de heparina.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

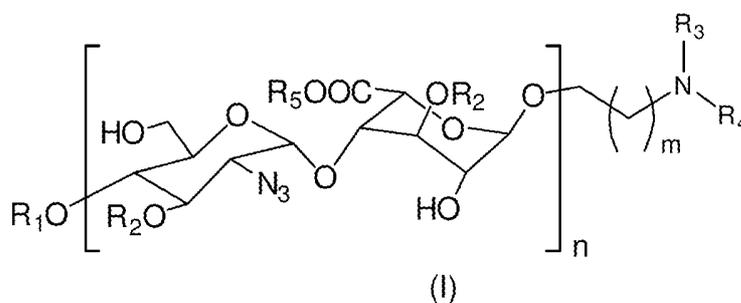
10

La presente invención describe un método rápido y de alto rendimiento para la O-sulfatación de precursores sintéticos de oligosacáridos de heparina utilizando radiación microondas. Este procedimiento facilita en gran medida la preparación de este tipo de carbohidratos altamente sulfatados, evitando problemas experimentales asociados al uso de complejos de trióxido de azufre en las condiciones tradicionales.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de O-sulfatación de oligosacáridos que comprende una etapa de calentamiento mediante microondas de la mezcla de reacción.

En una realización preferida, el procedimiento de O-sulfatación de oligosacáridos comprende las siguientes etapas:

a) mezclar el oligosacárido de fórmula (I)



25

donde

$R_1$  y  $R_2$  se seleccionan independientemente entre H o grupos protectores,

$R_3$  y  $R_4$  se selecciona independientemente entre H, alquilo  $C_1-C_6$  o  $-C(O)OR_6$ , donde  $R_6$  se selecciona entre H, arilo, alquilo  $C_1-C_4$ ,

5  $R_5$  se selecciona entre H, arilo o alquilo  $C_1-C_4$ ,

m es un valor entre 1 y 8,

n es un valor entre 1 y 5

con un complejo de coordinación  $SO_3 \cdot R_7$ , donde  $R_7$  es una amina primaria, secundaria o terciaria sustituida por alquilo  $C_1-C_6$  o una amina heterocíclica,

10 en un disolvente orgánico.

b) calentar la mezcla obtenida en (a) mediante microondas a una temperatura entre 50 y 150°C.

15 En la presente invención, el término "alquilo" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 6, y más preferiblemente de 1 a 4 y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo etc.

20 Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno (denominándose haloalquilo), hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

25 El término "arilo" se refiere en la presente invención a un radical fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo. El radical arilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como alquilo, haloalquilo, aminoalquilo, dialquilamino, hidroxilo, alcoxilo, fenilo, mercapto, halógeno, nitro, ciano y alcocarbonilo.

30

En la presente invención se entiende como amina primaria un grupo  $NH_2R$ , como amina secundaria un grupo  $NHRR'$  y como amina terciaria un grupo

NRR'R'', donde los grupos R, R' y R'' son grupos alquilo iguales o diferentes y preferiblemente grupos alquilo de entre 1 a 6 carbonos.

En la presente invención se entiende como grupo protector un grupo químico que reacciona con un grupo funcional de un reactivo con el objetivo de obtener quimiospecificidad en una reacción química. Ejemplos no limitantes de grupos protectores son:

A. Grupos protectores de alcoholes:

- $\beta$ -Metoxietoximetil éter (MEM)
- 10 • Acetilo (Ac)
- Metoximetiléter (MOM)
- *p*-Metoxibenciléter (PMB)
- Metiltiometiléter
- Pivaloil (Piv)
- 15 • Tetrahidropirano (THP)
- Éter de sililo (trimetilsililo (TMS), *tert*-butildimetilsililo (TBDMS) y triisopropilsililo (TIPS)
- Éteres de metilo
- Éteres de etoxietilo (EE)

20 B. Grupos protectores de aminas:

- Carbobenciloxi (Cbz)
- *p*-metoxibencilcarbonilo (Moz o MeOZ) *tert*-butiloxycarbonilo (BOC),
- 9-Fluorenilmetiloxycarbonil (FMOC),
- 25 • Bencilo (Bn)
- *p*-metoxibencilo (MPM)
- 3,4-dimetoxibencilo (DMPM)
- *p*-metoxifenilo (PMP)
- Tosilo (Ts)
- 30 • Otras sulfonamidas (Nosilo y Nps)

C. Grupos protectores de carbonilo:

- Acetales y cetales

- Ditanos
- Acilales

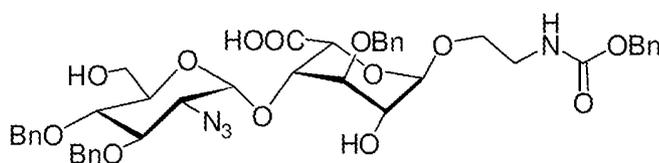
D. Grupos protectores de ácidos carboxílicos:

- Ésteres de metilo
- Ésteres de bencilo
- Ésteres de tert-butilo
- Ésteres de sililo.

Preferiblemente,  $R_1$  y  $R_2$  son grupos protectores que se seleccionan independientemente de entre bencilo, p-metoxibencilo, acetato, benzoato, pivaloato, levulino, trialquilsililo o triarilsililo. Más preferiblemente,  $R_1$  y  $R_2$  son bencilo.

Preferiblemente,  $R_3$  es  $-C(O)OBencilo$  y  $R_4$  es H.

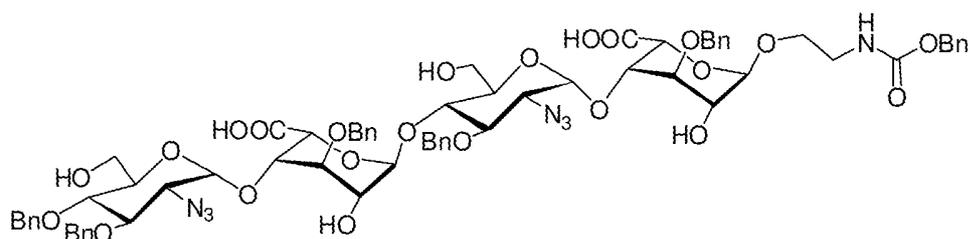
Preferiblemente, n es 1. y más preferiblemente, el oligosacárido empleado en el procedimiento es el compuesto de fórmula (II):



20

(II)

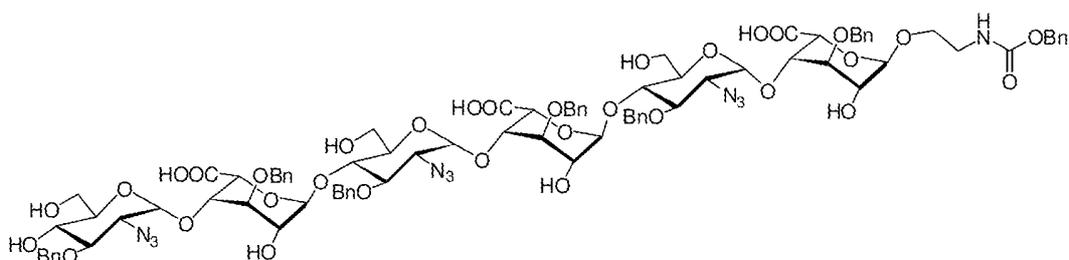
Preferiblemente, n es 2, y más preferiblemente el oligosacárido empleado en el procedimiento es el compuesto de fórmula (III):



7

(III)

Preferiblemente, n es 3 y más preferiblemente el oligosacárido empleado en el procedimiento es el compuesto de fórmula (IV):



(IV)

Preferiblemente, R<sub>7</sub> se selecciona entre -NMe<sub>3</sub> o -NEt<sub>3</sub>.

10 Preferiblemente, R<sub>7</sub> es piridina.

Preferiblemente, el disolvente orgánico empleado en el procedimiento de la presente invención se selecciona entre N,N'-dimetilformamida o piridina.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la

20 presente invención.

## EJEMPLOS

25 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del procedimiento.

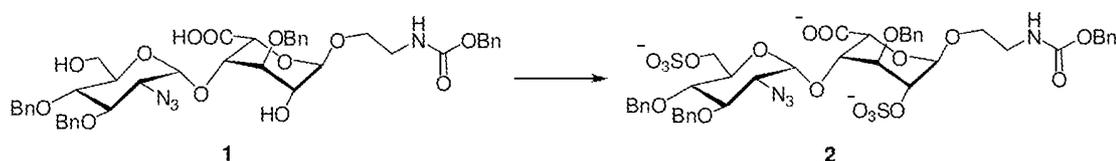
## 1. Procedimiento general para la per-O-sulfatación con microondas

Las reacciones de sulfatación con microondas se han llevado a cabo en recipientes sellados en un equipo "Biotage Initiator". El azúcar polihidroxilado (7-14  $\mu\text{mol}$ , 1.0 equiv.), el complejo de  $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$  (5 equiv. por grupo OH; Sigma-Aldrich; el complejo se lavó previamente con  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se secó a alto vacío) y un imán fueron introducidos en un vial para reacciones con microondas de 5 mL, que se selló con un septum. El septum se pinchó con una aguja que se conectó a alto vacío y la mezcla se dejó secar durante 12 h. A continuación se pasó argón, se añadió DMF seca (1.0 mL) y la mezcla de reacción fue sometida a radiación microondas durante 15-30 min a  $100^\circ\text{C}$  (potencia media de 80 W). La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se paró con  $\text{Et}_3\text{N}$  (150  $\mu\text{L}$ ). Se añadió MeOH (1 mL) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL), y la mezcla de reacción se pasó por una columna cromatográfica de Sephadex LH-20 que se eluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (1:1), obteniéndose la correspondiente sal de trietilamonio (rendimientos 90-99%). La elución de una columna Dowex 50WX4- $\text{Na}^+$  con MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  3:1 dio lugar a la correspondiente sal sódica.

## 2. Síntesis del disacárido sulfatado 2

Se procedió a la síntesis del disacárido sulfatado **2** a partir de **1** (tabla 1) usando el método tradicional de sulfatación con  $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$  a  $60^\circ\text{C}$  en DMF (calentamiento en baño de aceite, entrada 1). El seguimiento por cromatografía en capa fina (CCF) indicaba una velocidad de reacción muy baja. Para completar la reacción fue necesario utilizar un gran exceso de reactivo sulfatante (20 equivalentes por grupo OH) y un tiempo de reacción muy elevado (7 días). Previamente, se habían descrito problemas similares en la O-sulfatación de ciertos oligosacáridos de heparina parcialmente protegidos. El calentamiento con microondas reduce enormemente el tiempo de reacción, utilizando las mismas condiciones, con tan solo 5 equivalentes de complejo  $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$  por grupo OH (entrada 2). El disacárido **2** se obtiene puro y con un rendimiento excelente después de la purificación cromatográfica con Sephadex

LH-20. Estos resultados demuestran el efecto de la radiación microondas en la reacción de sulfatación. Para evaluar el efecto de la temperatura, se llevo a cabo la reacción a 100 °C (entradas 3 y 4). En tan solo 15 min se obtuvo el compuesto **2** con un rendimiento del 91%, mientras que el calentamiento con microondas durante 1 h conlleva un ligero aumento del rendimiento hasta un 98%. Resulta interesante que, bajo estas condiciones, no se ha detectado la *N*-sulfatación del carbamato. Se obtuvieron resultados similares utilizando el complejo SO<sub>3</sub>·Py en Py a 60°C (entrada 5).



10

**Tabla 1.** Sulfatación con microondas del disacárido **1**

Entrada	Reactivo sulfatante	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción	Rendimiento(%)
1	SO <sub>3</sub> ·NMe <sub>3</sub> (20 equiv. por grupo OH)	DMF	60 <sup>a</sup>	7 d	cuantitativo <sup>b</sup>
2	SO <sub>3</sub> ·NMe <sub>3</sub> (5 equiv. por grupo OH)	DMF	60	7 h	94
3	SO <sub>3</sub> ·NMe <sub>3</sub> (5 equiv. por grupo OH)	DMF	100	1 h	98
4	SO <sub>3</sub> ·NMe <sub>3</sub> (5 equiv. por grupo OH)	DMF	100	15 min	91
5	SO <sub>3</sub> ·Py (5 equiv. por grupo OH)	Py	60	15 min	cuantitativo

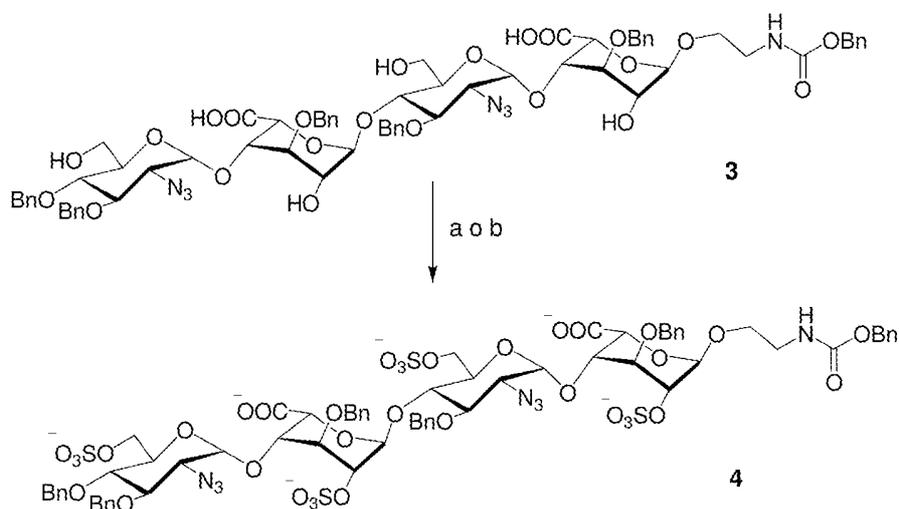
<sup>a</sup> Calentamiento convencional (baño de aceite)

<sup>b</sup> Estimado por CCF

15

### 3. Síntesis del tetrasacárido 3

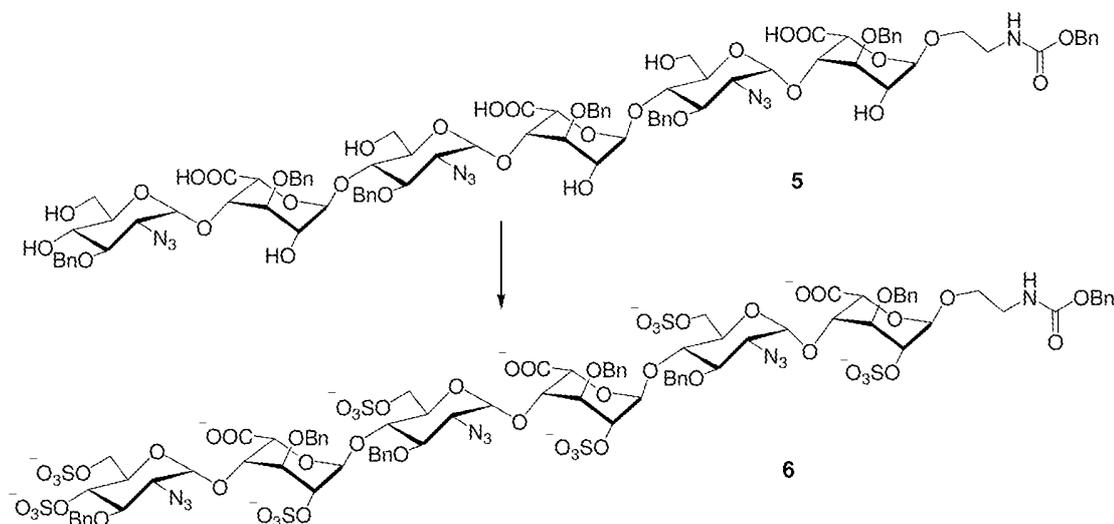
Una vez optimizada la *O*-sulfatación del disacárido modelo **1**, aplicamos el mismo procedimiento a oligosacáridos de heparina más complejos. Para la *O*-sulfatación del tetrasacárido **3**, el método tradicional de calentamiento en baño de aceite resultó bastante problemático (esquema 1). El tratamiento con  $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$  dio lugar a una mezcla de productos parcialmente sulfatados. Cuando se usó un gran exceso de complejo de sulfatación, durante un prolongado tiempo de reacción, no se observó ninguna mejora. Después de purificar por Sephadex LH-20, el crudo de reacción se trató con el complejo  $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ . Fue necesaria una purificación cromatográfica en fase reversa con relleno de C-18 para obtener el tetrasacárido **4** con un rendimiento moderado del 43%. Sin embargo, la misma reacción se completó sin problemas calentando con microondas, y se obtuvo **4** con un rendimiento excelente después de la filtración por Sephadex LH-20 (esquema 1).



**Esquema 1.** Sulfatación del tetrasacárido **3**. Reactivos y condiciones: a)  $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$  (>10 equiv. por grupo OH), DMF, 60°C,  $\geq 3$  d; a continuación  $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$  (10 equiv. por grupo OH), Py, temperatura ambiente, 48 h, 43%; b)  $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$  (5 equiv. por grupo OH), DMF, 100°C, microondas, 30 min, 95%.

#### 4. Síntesis del hexasacárido 6

El siguiente objetivo fue la preparación del hexasacárido **6** que contiene 7 grupos sulfato en su estructura (tabla 2). La sulfatación con microondas se llevó a cabo con el complejo  $\text{SO}_3 \cdot \text{NMe}_3$  a  $100^\circ\text{C}$  y para optimizar el tiempo de reacción necesario, éste se varió entre 5 y 30 min (entradas 1-3). Con 30 min de reacción se obtuvo el hexasacárido **6** con un rendimiento excelente del 90%. Es interesante indicar que cuando se realizó la reacción con el complejo  $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ , se observó por CCF una mezcla de derivados parcialmente sulfatados (entrada 4). El análisis por CCF de esta mezcla de reacción no mostró progresión alguna después de aumentar la temperatura por encima de  $100^\circ\text{C}$  y aumentar el tiempo de reacción. En la bibliografía se han descrito resultados similares para la sulfatación de ciertos oligosacáridos de heparina usando el complejo  $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ .



**Tabla 2.** Sulfatación con microondas del hexasacárido **5**

Entrada	Reactivo sulfatante	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción	Rendimiento (%)
1	SO <sub>3</sub> ·NMe <sub>3</sub> (5 equiv. por grupo OH)	DMF	100	5 min	20 <sup>a</sup>
2	SO <sub>3</sub> ·NMe <sub>3</sub> (5 equiv. por grupo OH)	DMF	100	20 min	80 <sup>a</sup>
3	SO <sub>3</sub> ·NMe <sub>3</sub> (5 equiv. por grupo OH)	DMF	100	30 min	90
4	SO <sub>3</sub> ·Piridina (5 equiv. por grupo OH)	Piridina	60→100	5 min→2 h	25 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Estimado por CCF

5

En conclusión, se describe un procedimiento para la per-*O*-sulfatación de precursores sintéticos de oligosacáridos de heparina. La aplicación de la radiación microondas ha reducido espectacularmente los tiempos de reacción, permitiendo que la sulfatación de productos desde di- hasta hexasacáridos transcurra rápidamente y con alto rendimiento. Cabe destacar que los cortos tiempos de reacción empleados en estas reacciones (15-30 min) permiten el uso de temperaturas más altas que en el caso del calentamiento convencional, sin que se produzca descomposición del azúcar. Se espera que este

10

procedimiento acelere la preparación de estos compuestos, superando así uno de las mayores dificultades de la síntesis de GAGs.

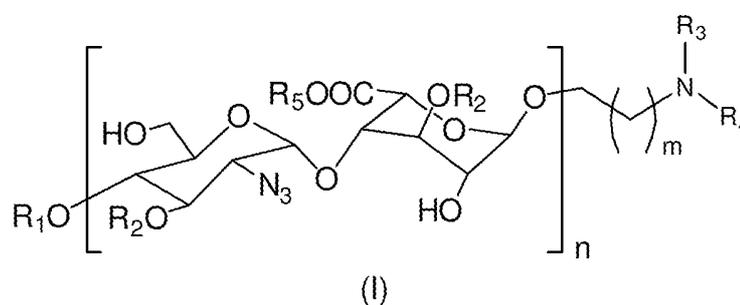
**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de O-sulfatación de oligosacáridos que comprende una etapa de calentamiento mediante microondas de la mezcla de reacción.

5

2. Procedimiento de O-sulfatación de oligosacáridos según la reivindicación 1 que comprende:

- a. mezclar el oligosacárido de fórmula (I)



10

donde

$R_1$  y  $R_2$  se seleccionan independientemente entre H o grupos protectores,

$R_3$  y  $R_4$  se selecciona independientemente entre H, alquilo  $C_1-C_6$  o  $-C(O)OR_6$ , donde  $R_6$  se selecciona entre H, arilo, alquilo  $C_1-C_4$ ,

15

$R_5$  se selecciona entre H, arilo o alquilo  $C_1-C_4$ ,

$m$  es un valor entre 1 y 8,

$n$  es un valor entre 1 y 5

20

con un complejo de coordinación  $SO_3 \cdot R_7$ , donde  $R_7$  es una amina primaria, secundaria o terciaria sustituida por alquilo  $C_1-C_6$  o una amina heterocíclica, en un disolvente orgánico.

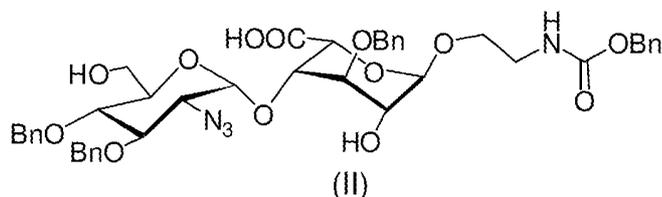
- b. calentar la mezcla obtenida en (a) mediante microondas a una temperatura entre 50 y 150°C.

25

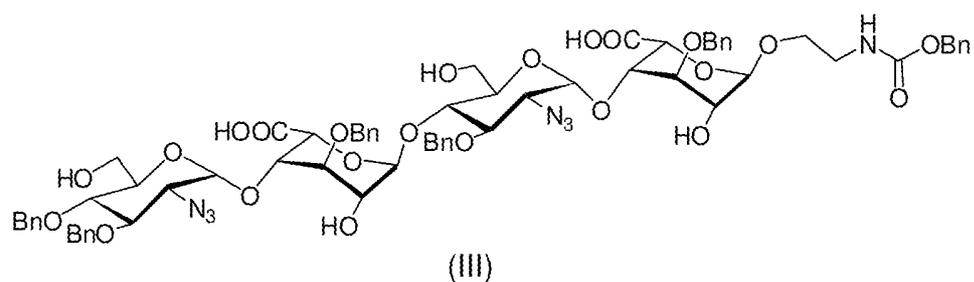
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde  $R_1$  y  $R_2$  son grupos protectores que se seleccionan independientemente de entre

bencilo, p-metoxibencilo, acetato, benzoato, pivaloato, levulino, trialkilsililo o triarilsililo.

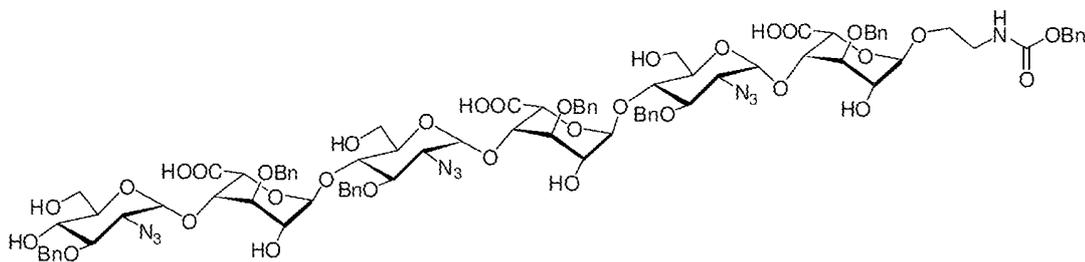
4. Procedimiento según la reivindicación 3 donde  $R_1$  y  $R_2$  son bencilo.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde  $R_3$  es -C(O)Obencilo y  $R_4$  es H.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde n es 1.
7. Procedimiento según la reivindicación 6 donde el oligosacárido es el compuesto de fórmula (II):



8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde n es 2.
9. Procedimiento según la reivindicación 8 donde el oligosacárido es el compuesto de fórmula (III):



10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde n es 3.
11. Procedimiento según la reivindicación 10 donde el oligosacárido es el compuesto de fórmula (IV):



(IV)

5 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde  $R_7$  se selecciona entre  $N(CH_3)_3$  o  $N(CH_2CH_3)_3$ .

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde  $R_7$  es piridina.

10

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde el disolvente orgánico se selecciona entre  $N,N'$ -dimetilformamida o piridina.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2011/070645

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C07B45/02** (2006.01)

**C07H5/04** (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)

**C07B, C07H**

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, XPESP, NPL, CAS.**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SUSANA MAZA et al. "Microwave-assisted sulfonation of heparin oligosaccharides" Tetrahedron Letters, 2011, Vol. 52, pages 441-443. See page 441, abstract; page 442; page 443, column 1, paragraphs 1-3.	1-14
X	XING, R. et al. "Preparation of low-molecular-weight and high-sulfate-content chitosan under microwave radiation and their potential antioxidant activity in vitro". Carbohydrate Research, 2004, Vol. 339, pages 2515-2519. See page 2515, Abstract; page 2516, Section 2.4.	1, 14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
**19/12/2011**

Date of mailing of the international search report  
**(15/02/2012)**

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
N. Martín Laso

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

Telephone No. 91 3493278

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070645

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE PAZ, J.L. et al "Synthesis and Biological Evaluation of a Heparin-Like Hexasaccharide with the Structural Motifs for Binding to FGF and FGFR". European Journal of Organic Chemistry, 2005, pages 1849-1858. See Abstract; page 1852, Esquema 3; page 1857, paragraphs 2 and 3.	1-14
A	AL-HORANI, R. A. et al. "Chemical sulfation of small molecules-advances and challenges". Tetrahedron, 2010, Vol. 66, pages 2907-2918. See paragraph 2.3.	1-14
A	US 2004/0242801 A1 (ORGANES, TISSUS: REGENERATION, REPARATION, REMPLACEMENT - OTR3) 02/12/2004. See paragraphs 25, 26 and 54.	1-14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2011/070645

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2004242801 A	02.12.2004	FR2832708 AB	30.05.2003
		CA2468759 AC	05.06.2003
		WO03046014 A	05.06.2003
		AU2002365302 A	10.06.2003
		AU2002365302 B	26.02.2009
		EP1456247 AB	15.09.2004
		US7396923 B	08.07.2008
		JP2005510587 A	21.04.2005
		JP4394950B2 B	06.01.2010
		CN1617889 A	18.05.2005
		CN1286852 C	29.11.2006
		AT371674 T	15.09.2007
		ES2292851 T	16.03.2008
		DE60222172 T	12.06.2008
IL162192 A	31.05.2011		
-----			

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070645

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07B45/02** (2006.01)

**C07H5/04** (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)

**C07B, C07H**

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, XPESP, NPL, CAS.**

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	SUSANA MAZA et al. "Microwave-assisted Sulfonation of heparin oligosaccharides" Tetrahedron Letters, 2011, Vol. 52, páginas 441-443. Ver página 441, resumen; página 442; página 443, column 1, párrafos 1-3.	1-14
X	XING, R. et al. "Preparation of low-molecular-weight and high-sulfate-content chitosan under microwave radiation and their potential antioxidant activity in vitro". Carbohydrate Research, 2004, Vol. 339, páginas 2515-2519. Ver página 2515, Resumen; página 2516, Apartado 2.4.	1, 14

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:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"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).

"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.

"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.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"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.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**19/12/2011**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**15 de febrero de 2012 (15/02/2012)**

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

N. Martín Laso

Nº de teléfono 91 3493278

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070645

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	DE PAZ, J.L. et al "Synthesis and Biological Evaluation of a Heparin-Like Hexasaccharide with the Structural Motifs for Binding to FGF and FGFR". European Journal of Organic Chemistry, 2005, páginas 1849-1858. Ver Resumen; página 1852, Esquema 3; página 1857, párrafos 2 y 3.	1-14
A	AL-HORANI, R. A. et al. "Chemical sulfation of small molecules-advances and challenges". Tetrahedron, 2010, Vol. 66, páginas 2907-2918. Ver apartado 2.3.	1-14
A	US 2004/0242801 A1 (ORGANES, TISSUS: REGENERATION, REPARATION, REMPLACEMENT - OTR3) 02/12/2004. Ver párrafos 25, 26 y 54.	1-14

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070645

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2004242801 A	02.12.2004	FR2832708 AB	30.05.2003
		CA2468759 AC	05.06.2003
		WO03046014 A	05.06.2003
		AU2002365302 A	10.06.2003
		AU2002365302 B	26.02.2009
		EP1456247 AB	15.09.2004
		US7396923 B	08.07.2008
		JP2005510587 A	21.04.2005
		JP4394950B2 B	06.01.2010
		CN1617889 A	18.05.2005
		CN1286852 C	29.11.2006
		AT371674 T	15.09.2007
		ES2292851 T	16.03.2008
		DE60222172 T	12.06.2008
IL162192 A	31.05.2011		
-----			