

37
64

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
ABOGADOS
Carrera 9 No. 93 - 09
A.A. 8348
Santa Fe de Bogotá, D.C., COLOMBIA

Señora

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO	
Radicación: 000-095-00000002	Folios: 37
Fecha (MM): 2000-11-21 14:11:13	
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 325 COMPLETOS	
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	

Ref.: Expediente No. 00-064.095

**Solicitud de Patente de Invención titulada : "OLIGOSACARIDOS
DERIVADOS DE RIBOSA-RIBITOL-FOSFATO Y VACUNAS QUE LOS
CONTIENEN"**

**Solicitante: UNIVERSIDAD DE LA HABANA y UNIVERSIDAD DE
OTTAWA.**

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad,
identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente me
permito presentar a usted la copia certificada del documento de Prioridad
de Cuba No. CU 121/99 de Agosto 30 de 1.999.

En consecuencia atentamente solicito a Ud. se anexe dicho documento al
expediente correspondiente a esta solicitud de Patente de Invención.

Del Señor Jefe,

Margarita Castellanos Abondano
Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. 39.779.654 de Usaquén
T.P.A. No. 70819 del Consejo Sup. de la Judicatura
Carrera 9ª. No. 93 - 09 -de Bogotá
Teléfonos: 610 74 80 y 610 74 60

Santa Fe de Bogotá, D.C.,
xgt/4768

21 NOV. 2000

Colombia



4768

65

REPÚBLICA DE CUBA



Lic. América N. Santos Riveras, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número ciento veintiuno del año mil novecientos noventa y nueve del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **NUEVOS OLIGOSACARIDOS DERIVADOS DE RIBOSA-RIBITOL-FOSFATO, METODOS PARA PREPARARLOS, INMUNOGENOS QUE LOS COMPRENDEN Y VACUNAS QUE COMPRENDEN DICHS INMUNOGENOS**, con fecha treinta de agosto de mil novecientos noventa y nueve, a las quince horas y treinta y siete minutos pasado meridiano, por María Teresa Cabrera Pedroso, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación de la **UNIVERSIDAD DE LA HABANA** y de la **UNIVERSIDAD DE OTTAWA**, cuya invención fue creada por Vicente Guillermo Verez Bencomo y René Roy.

ASIMISMO: CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIEN CERTIFICO: Que la Memoria Descriptiva, Reivindicaciones y Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de María Teresa Cabrera Pedroso, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los doce días del mes de septiembre de dos mil.



Lic. América N. Santos Riveras
Directora General

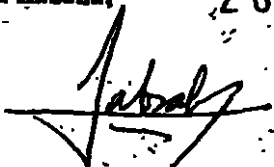
Funcionario Autorizado para certifi-
car autenticaciones de firma.

CERTIFICO: Que la firma que ante-
cede, al parecer es auténtica del fun-
cionario autorizante de este docu-
mento por la semejanza que guarda
con la que obra registrada en esta
Institución como la que el mismo
acostumbra a usar en sus actos ofi-
ciales.

En fe de lo cual autorizo la presente
con mi firma y sello de esta Institu-
ción.

Ciudad de la Habana,

20 10 00

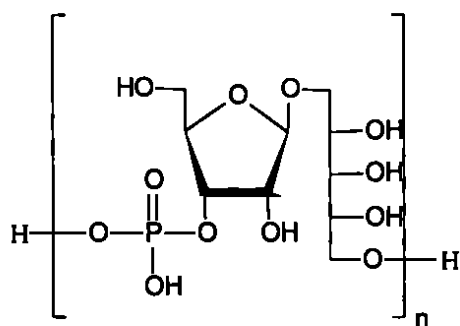
A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'J. Abad', is written over a faint, circular official stamp. The signature is bold and stylized.

66

11



El polisacárido capsular posee la siguiente estructura:



Se ha demostrado que el principal problema es su naturaleza, pues al ser un polisacárido, es un antígeno T-independiente que no es capaz de estimular el sistema inmune del niño, aún inmaduro. Ha quedado demostrado que es posible resolver el problema uniendo (conjugando) covalentemente el polisacárido a una proteína a la que se le denomina "carrier". El producto formado, que se conoce como vacuna conjugada, logra inducir niveles de anticuerpos protectores a partir de los 2 meses de edad.

Chu y col., *Infection immunity* 1983, 40, 245-256 preparan el conjugado del polisacárido nativo con toxoide tetánico, después de activarlo con bromuro de cianógeno.

Gordon, US Pat No 4,496,538 activa el polisacárido natural con bromuro de cianógeno y luego lo conjuga a toxoide diftérico a través de la hidracida del ácido adípico.

Hilman y col., US Pat No 4,459,286 luego de activar el polisacárido capsular lo conjuga a través del ácido 6-amino caproico a la proteína de la membrana externa del meningococo

En todos los casos anteriores, cuando se realiza el proceso de conjugación, la unión por un enlace covalente ocurre al mismo tiempo entre varios grupos del polisacárido capsular y de la proteína carrier. La eficiencia en la inducción de inmunidad protectora en el niño depende de la estructura del conjugado o sea de la forma en que se efectúa esa unión. Cuando se conjuga el polisacárido natural, los grupos que intervienen en la unión con la proteína resultan ubicados en puntos diferentes del polisacárido distribuidos de manera arbitraria a lo largo de la cadena, lo que dificulta el control de cada lote.

Estas vacunas resultan muy difíciles de analizar por métodos físico-químicos por lo que se ha establecido como practica común evaluar cada lote a través de estudios de inmunogenicidad en animales de experimentación. Sin embargo, el conjugado se comporta a veces de manera diferente en el niño que en animales. Es criterio de la Organización Mundial de la Salud, M. R. Holliday, C. Jones, *Biologicals*, 1999, 27, 51-53, que para lograr una calidad estable, el control de las vacunas conjugadas debe basarse en métodos físico-químicos que permitan demostrar la identidad del producto de un lote a otro.

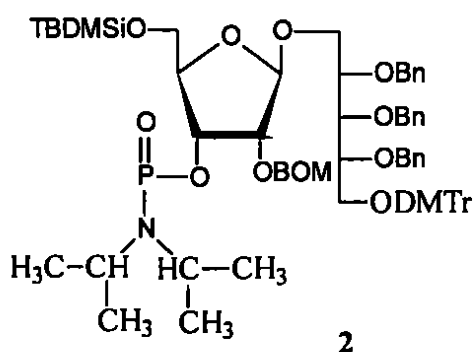
Para facilitar esta tarea, las vacunas conjugadas deben ser cada vez más definidas molecularmente. Una alternativa de solución a este problema es la síntesis de fragmentos del

28 S
67

polisacárido capsular. El proceso de construcción del antígeno por síntesis consta de dos grandes etapas, la primera es la obtención del disacárido intermediario y la segunda su oligomerización. Se han propuesto varias vías para esta síntesis:

Beuvery y col., EPO 0276 516, US Pat 5,034,519, Tetrahedron Lett. 28, 1553, 1987, Hoogerhout y col., J. Carbohydr. Chem, 7, 1988, 399-416 obtienen por síntesis un fragmento del polisacárido capsular que reivindican contiene de 3 a 20 unidades repetitivas. Para ello sintetizan el disacárido intermediario **2** y con el mismo a través de síntesis en solución o en fase sólida, logran obtener oligosacáridos hasta de 6 unidades repetitivas Elie y col., Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 108, 1989, 219. Estos oligosacáridos son conjugados a proteínas o péptidos a través de un espaciador. El conjugado de un fragmento de 3 unidades demostró ser tan inmunogenico en ratones como las vacunas comerciales obtenidas por conjugación del polisacárido natural.

En el ejemplo óptimo que ilustra la vía de síntesis seguida se realizan las siguientes operaciones: 1-síntesis del ribitol, 2-union con la ribosa, 3-introduccion selectiva de los sustituyentes de la ribosa, 4-introduccion de la función activa del fósforo. Esta vía de síntesis permite llegar al derivado del disacárido **2** que sirve como intermediario central en solo 15 etapas de reacción.



El rendimiento global es de 7 %, Hermans y col., Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 1987, 106, 498-504. El proceso tiene dos serios inconvenientes: Se emplean 11 pasos cromatográficos y los grupos protectores del intermediario central no son los idóneos para el proceso de oligomerización.

En la oligomerización, o segunda etapa de síntesis, se empleó el método en solución con activación a partir del fosfotriester que permite rendimientos en base al disacárido de 70-90% por ciclo. Este procedimiento tiene el inconveniente de no permitir la síntesis de fragmentos mayores de 4 unidades repetitivas pues los rendimientos decrecen rápidamente. El disacárido intermediario **2** tiene 3 tipos diferentes de grupos protectores lo que dificulta la desprotección del producto al final de la síntesis y por lo tanto no es el mas conveniente para su empleo en oligomerización por fase sólida. No obstante se reporta su uso para la preparación de un hexámero.

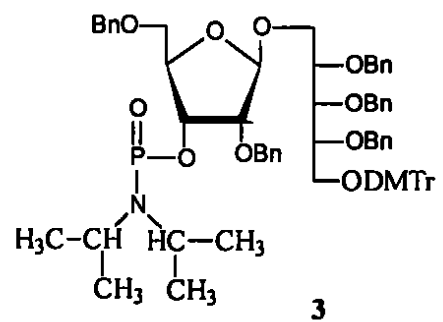
En los ensayos inmunológicos, Peters CCAM, y col, Infect. Immunity 1991, 59, 3504-10, solo se reporta la conjugación de un trimero a toxoide tetanico y su inmonegenicidad en ratones y monos.

28/6

69

G. Just, J. Upešlacis, EPO 0 320 942, L. Chan, G. Just, Tetrahedron, 46, 1990, 151-162 sintetizan también un fragmento del polisacárido capsular a través de un disacárido intermediario y síntesis en solución. Con el fin de obtener el intermediario óptimo para la síntesis del antígeno se recurre a una vía de síntesis diferente: 1-síntesis del ribitol 2-síntesis de la ribosa con los grupos protectores adecuados 3-unión de la ribosa y el ribitol 4-introducción de la función activa del fósforo.

Esto permite seguir un procedimiento que llega a un disacárido intermediario 3 como fosforamidito que por sus grupos protectores tiene cualidades superiores en el proceso de oligomerización. Para lograr este objetivo fue necesario un número mayor de pasos de síntesis. Se llega al derivado clave en 19 etapas de síntesis y el empleo de 8 pasos de purificación cromatográfica



Con el disacárido intermediario 3 se procede a la oligomerización en solución lo que permite obtener fragmentos del polisacárido capsular de 3 unidades repetitivas con rendimientos en base al disacárido que oscilan entre un 70-90% por ciclo.

Kandil y col., Syn. Lett., 1992, 555-7, Chon y col., WO93 15205 y US 5 679, 352, Sintetizan un fragmento del polisacárido capsular empleando el mismo disacárido intermediario 3 y por síntesis en fase sólida usando como soporte monometoxipolietilenglicol logran obtener fragmentos de hasta 6 unidades repetitivas del antígeno, la incorporación reportada por ciclo es de 95%.

Krivan, y col., WO 9400149, Nilsson, y col., J. Carbohydr. Chem. 10, 1991, 1-22 logran obtener un fragmento de 10 unidades repetitivas con un disacárido intermediario similar y fase sólida. Posteriormente lo conjugan a través de un espaciador a la adhesina del Hib. El fosfonato intermediario se prepara luego de 21 etapas de síntesis con un rendimiento global reportado de 5 %. Se requieren además de un total de 7 pasos cromatográficos. Posteriormente el proceso de oligomerización se realiza a través de fase sólida por el método de los fosfonatos y resina de Merrifield aminada llegando al antígeno con 97-99% de incorporación por ciclo.

Chiu Machado y col, J. Carbohydr. Chem., 13 1994, 465-74, certificado de autor 22424 reportan un procedimiento eficiente para obtener un derivado de la ribosa protegido a partir de glucosa y con el mismo llegan al disacárido intermedio en 20 etapas de reacción.

Uno de los aspectos que dificulta la aplicación de la síntesis a la obtención de fragmentos de Hib para su empleo en vacunas es la síntesis del disacárido intermediario. Los métodos enumerados anteriormente reflejan el estado alcanzado en la química de los

80-7
70

carbohidratos moderna, sin embargo adolecen de dos serios problemas técnicos: El empleo de numerosas etapas cromatográficas a lo largo de la síntesis que hace impracticable su realización a escala industrial y el número de etapas de síntesis que es elevado. El problema fundamental que impide la síntesis del disacárido en menos etapas es la introducción de los grupos bencilo en la unidad de ribosa.

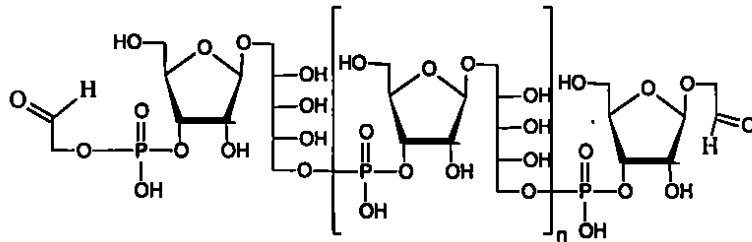
El proceso de oligomerización del disacárido intermediario puede realizarse en solución, con el serio inconveniente que el tamaño del antígeno que se puede alcanzar está limitado a 3-4 unidades repetitivas o también puede realizarse por fase sólida. La fase sólida permite alcanzar oligosacáridos de una talla 6 y 10 unidades repetitivas con incorporaciones por ciclo muy altas. Sin embargo, el método tiene dos serios inconvenientes: el rendimiento real del proceso es de solo un 10-15 %, pues para alcanzar incorporaciones superiores al 95% por ciclo, se requiere de un exceso del disacárido que varía entre 3 y 10 moles-equivalentes que se pierden luego de efectuado el ciclo. Por otra parte, se deben sintetizar dos derivados diferentes del disacárido intermedio, uno que se une a la fase sólida y el otro se emplea en el crecimiento de la cadena.

Un aspecto común a todos los trabajos precedentes de síntesis del antígeno y que ha constituido uno de sus objetivos principales es la obtención de un solo fragmento oligosacarídico puro, que no contenga diferencias no solo en su estructura sino tampoco en el largo de su cadena. Todo esto se ha basado en el supuesto que un antígeno formado por una sola molécula es imprescindible para lograr vacunas conjugadas anti-Hib de calidad más estable, por su control más fácil.

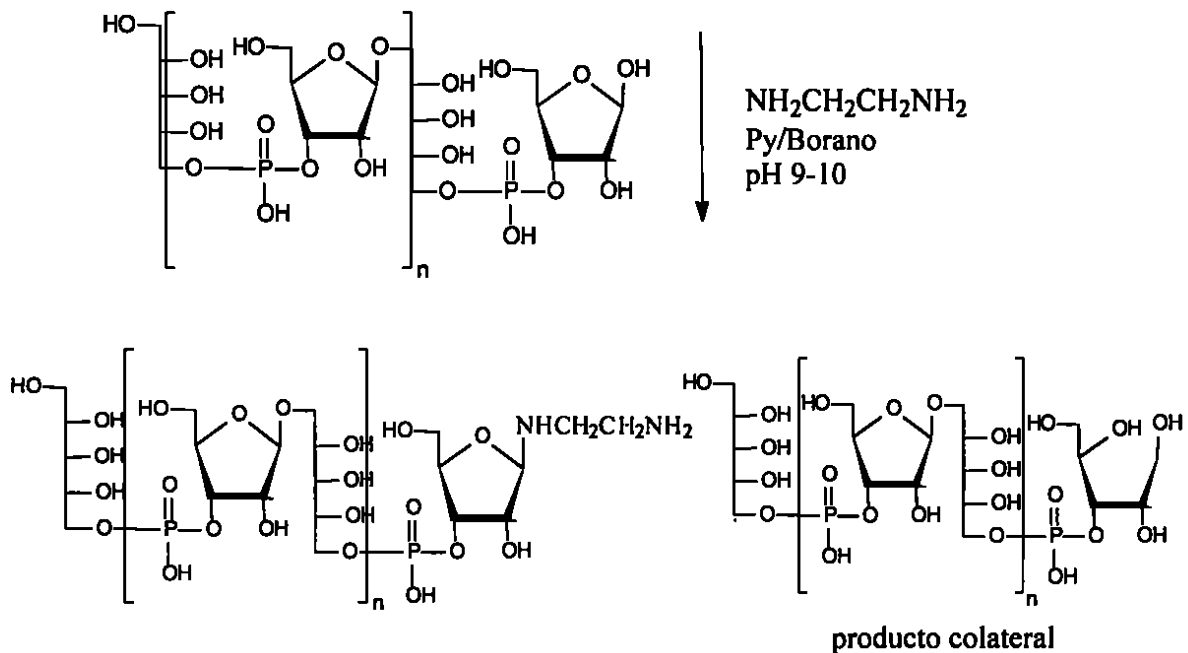
Con esta misma finalidad de mejorar y hacer más estable la calidad de las vacunas conjugadas, a los trabajos iniciales con los polisacáridos naturales, sucedieron otros donde se han obtenido fragmentos oligosacarídicos por fragmentación de polisacáridos naturales y se han descubierto métodos que activan la mezcla obtenida por uno o por los dos extremos terminales.

US Pat 4,808,700, US Pat 4,761,283, R. C. Seid, y col, Glycoconjugate J., 1989, 6, 489-98 oxidan el polisacárido natural con peryodato y purifican los fragmentos obtenidos. Los mezclas de fragmentos oligosacarídicos quedan de esta forma activados por los dos extremos como se muestra en el siguiente esquema. Estos oligosacáridos son posteriormente conjugados a través de una reacción de aminación reductiva a la proteína CRM 197. Como se puede observar en el siguiente esquema, los dos sitios de conjugación son diferentes, lo que provoca que una vez efectuada la conjugación existirán dos familias de oligosacáridos conjugados con estructuras diferentes. Por otra parte un porcentaje no muy bien determinado en el producto resulta de la unión de un mismo oligosacárido a dos sitios de la misma proteína

o a dos moléculas diferentes de proteínas. Todo esto genera heterogeneidad y dificulta el control.



US Pat 5,153, 312, P. Constantino y col, Vaccine 1999, 17, 1251-63, hidrolizan el polisacárido natural con ácido acético y purifican la mezcla de fragmentos oligosacáridicos resultantes. El producto es activado a través de una secuencia de reacciones donde se introduce el espaciador a través de aminación reductiva con etilendiamina a un pH y temperaturas elevados que pueden afectar la integridad de la mezcla de oligosacáridos. Por otra parte una proporción del antígeno se reduce por su grupo carbonilo terminal quedando inactivado como se muestra en el esquema siguiente. Posteriormente se realiza una reacción selectiva del antígeno con el éster activo del ácido adípico por uno solo de sus dos extremos. El otro extremo activado se emplea para la conjugación a la proteína.



Las dos vacunas preparadas a partir de productos de fragmentación del polisacárido capsular han demostrado a través de la practica de la inmunización a grandes masas de niños que es posible emplear oligosacáridos, no de un tamaño específico, sino de un rango de tallas, en la manufactura de vacunas conjugadas contra Hib y controlar adecuadamente la reproducibilidad y calidad del producto. Si bien los conjugados obtenidos por estas dos vías son mas definidos que los obtenidos por activación directa del polisacárido, es prácticamente imposible fragmentar un polisacárido capsular y después introducir un grupo funcional activo

en el mismo logrando la definición molecular y la pureza del antígeno a la que se puede llegar a través de la síntesis.

No existen ventajas evidentes en el control de la vacuna cuando se emplea un oligosacárido con una talla definida o una mezcla de oligosacáridos con respecto a la talla pero que mantiene homogénea el resto de su estructura. Ello ha quedado demostrado por el avance de los métodos de análisis que hacen posible determinar fácilmente la composición de una mezcla de fragmentos de oligosacáridos de Hib, P. Constantino, y col., *Vaccine* 1999, 17, 1251-1263, D. Prioti, y col., *European Carbohydrate Symposium*, Galway, July 1999, PB014. Por otra parte, no existen diferencias entre el comportamiento inmunológico de una vacuna conjugada compuesta por una mezcla de oligosacáridos de Hib de diferentes tallas, o por oligosacáridos de una sola talla, siempre y cuando los fragmentos sean mayores que 3 unidades repetitivas, S. Pillai, y col., *Infection and Immunity*, 1991, 59, 4371-6, A. A Kandil, y col., *Glycoconjugate J.*, 1997, 14, 13-7, Peters CCAM, y col., *Infect. Immunity* 1991, 59, 3504-10.

Existen circunstancias adicionales que dificultan la selección de una sola talla que resulte óptima desde todos los puntos de vista. Por una parte a favor de oligosacáridos entre 4-6 unidades repetitivas esta que se sintetizan con mayor facilidad, su tamaño es suficiente para inducir una respuesta inmune adecuada. Sin embargo, la cantidad de proteína carrier que se necesita en la vacuna es muy elevada y la estabilidad del oligosacárido incluido en la composición de la vacuna es inferior, pues el proceso de degradación que ocurre con la hidrólisis de enlaces fosfatos, provoca que inmediatamente después de comenzada la degradación, el fragmento unido al carrier queda con menos de 4 unidades repetitivas y se convierte en inactivo. Los fragmentos de una talla entre 8-20 unidades repetitivas, tienen como ventaja que aunque se degraden a la mitad de su talla, el fragmento unido al carrier mantendrá mas de 4 unidades repetitivas, por otra parte la cantidad de carrier que se necesita emplear por dosis de vacuna es inferior. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado hasta el presente para los oligosacáridos de Hib, es imposible obtener fragmentos de una talla entre 10-20 por los métodos de síntesis en solución y es muy difícil obtenerlos por los métodos en fase sólida. De facto, en ninguno de los reportes anteriores se presenta ningún ejemplo en que se haya logrado obtener oligosacáridos de esa talla. Otra desventaja es que el carácter T-dependiente de la respuesta inmune, aspecto indispensable para lograr una buena respuesta en el niño, es inferior a mayor talla del oligosacárido, C. Fernández, E.Sverremark, *Cell Immunol* 1994, 153, 67-78.

En resumen, cualquier vía de síntesis de antígenos de Hib que aspire a ser competitiva debe reducir el numero de etapas de síntesis del disacárido clave, reducir el numero de pasos

85-10
-73

cromatográficos y sobretodo incrementar de manera sensible los rendimientos del proceso de oligomerización.

Las mezclas de oligosacáridos obtenidas por hidrólisis del polisacárido natural al contener fracciones de ambos intervalos de tallas, reúnen las ventajas de cada uno y por otra parte amortiguan el efecto de sus desventajas. Si mezclas semejantes pudieran ser obtenidas por síntesis, éstas tendrían las ventajas de agrupar fracciones de los dos rangos de tallas, además su estructura, al ser diseñada por síntesis sería mas definida y pura al contener el espaciador en una proporción y posición precisas.

Hemos encontrado que se puede obtener por síntesis química de acuerdo a la presente invención una mezcla regular de oligosacáridos de forma más eficiente a como previamente habían sido obtenidos por síntesis oligosacáridos de talla definida. Esta mezcla tiene una pureza superior y se obtienen mas fácilmente que las mezclas de oligosacáridos obtenidas por fragmentación del polisacárido capsular. Se ha encontrado también que las vacunas conjugadas preparadas a partir de la mezcla son superiores en su manufactura y más sencillas en su control que cualquiera de las vacunas previamente descritas contra el *Haemophilus influenzae* tipo b.

Constituye objeto de la presente invención la mezcla de oligosacáridos que se caracteriza por ser obtenida por síntesis y por estar compuesta por una serie 4,5,6,7,8,...24,25 de sustancias que difieren entre si solo por n donde $n \geq 4$ y $n \leq 25$, y donde cada componente responde a una de las formulas globales representadas como 1, Esta mezcla comprende componentes de los dos grupos de tallas, <8 y >8 unidades repetitivas, y donde el espaciador se encuentra en uno solo de sus extremos (R_1 o R_2) en una posición prediseñada en la síntesis.

Otro objeto de la presente invención es el método de síntesis para llegar a los oligosacáridos antes mencionados que se caracteriza por ser un proceso de una sola etapa de síntesis y que consiste en una reacción de policondensación controlada en la que participan un derivado intermedio del disacárido clave, un espaciador y un promotor y que se caracteriza además porque a través de las proporciones de cada uno de los derivados, su orden de adición y el tiempo de reacción es posible controlar el tamaño promedio del antígeno.

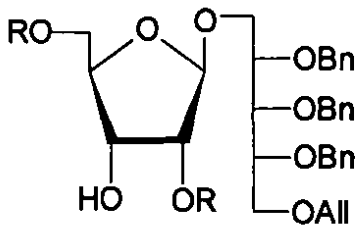
Constituye también un objeto de la presente invención el uso de las mezclas de oligosacáridos antes mencionados en la elaboración de inmunógenos a través de su conjugación a proteínas, péptidos, lípidos, u otra sustancia de las incluidas en la denominación de carrier.

Constituye otro objeto de la presente invención el empleo de los inmunógenos antes mencionados en la elaboración de vacunas contra las enfermedades provocadas por el *Haemophilus influenzae* tipo b con o sin el empleo de adjuvantes u otros aditivos.

84
74

Otro de los objetos de la presente invención es el empleo de la vacuna antes mencionada en la elaboración de vacunas combinadas con otras vacunas ya sean conjugadas o no, como por ejemplo la Hepatitis b, la DTP, las antimeningococcicas A, B, C, las anti-neumococos 1, 5, 6B, 6A, 14, 19F, 19A, 23F, y la vacuna anti-polio.

Otro de los objetos de la presente invención es la optimización del proceso de síntesis del disacárido clave requerido para la síntesis de los oligosacáridos del Hib, la mencionada optimización consiste en el descubrimiento de una reacción de bencilación selectiva que aplicada al disacárido 4 permite transformarlo en el disacárido 5 e introducir los grupos protectores bencilo en la unidad de ribosa en una sola etapa, acortando y simplificando significativamente el proceso de síntesis.



4 R = H
5 R = Bn

Constituye también un objeto de la presente invención el procedimiento óptimo diseñado para la síntesis del intermediario 4 que permite obtenerlo en forma pura en solo 11 etapas de reacción y sin el empleo de procesos cromatográficos.

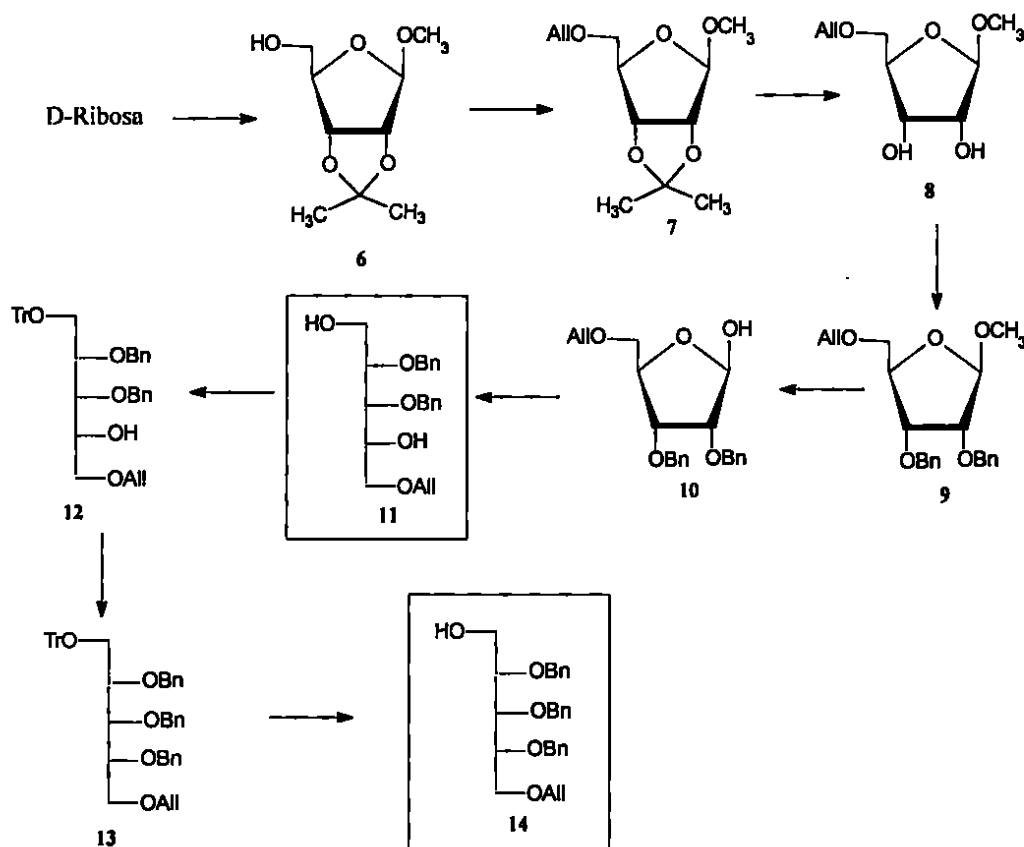
Otro de los objetos de la presente invención es el empleo de los oligosacáridos descritos anteriormente en la detección de anticuerpos anti-Hib a través de sus conjugados con sustancias inmunologicamente inertes como la poliacrilamida, poliestireno, látex lo que permite cuantificar los mencionados anticuerpos.

La novedad de la presente invención consiste en la propia composición de la mezcla de oligosacáridos obtenidos, que responden a la unidad repetitiva del polisacárido capsular del *Haemophilus influenzae* tipo b con un espaciador para su conjugación en uno solo de sus dos extremos, en una posición prediseñada en la síntesis y que responden siempre a la misma estructura regular y homogénea. La mezcla de oligosacáridos por su composición que incluye fragmentos de los dos grupos de tallas; 4-6 y 8-20 reúne las ventajas de los compuestos individuales y disminuye las desventajas que cada uno de ellos pudiera tener. Además, la novedad de la presente invención esta en el propio proceso de elaboración de estas mezclas a través de síntesis que permite obtener el producto con alta reproducibilidad y eficiencia. La novedad de la presente invención esta además en el descubrimiento de una reacción que permite introducir los grupos protectores bencilo en la unidad de ribosa en una sola etapa e

85 12
75

incrementar la eficacia en la obtención del disacárido intermediario clave para la síntesis de los mencionados oligosacáridos.

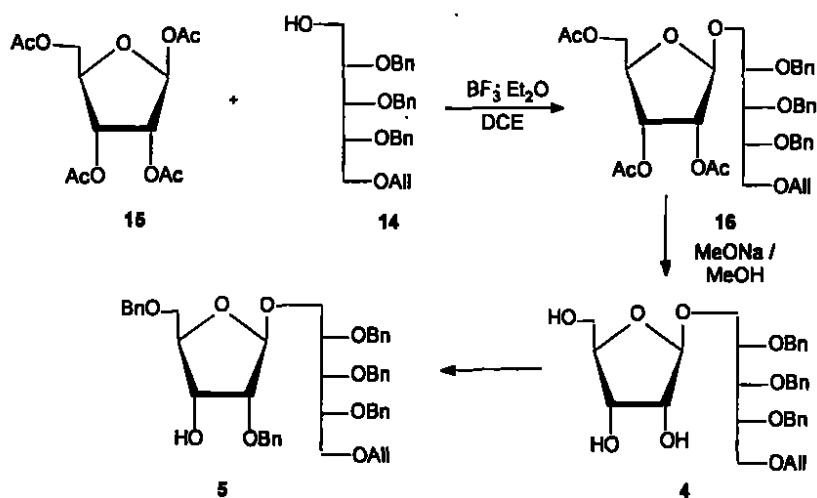
La síntesis del disacárido intermediario se inicia con la obtención del derivado 5-O-alil-2,3,4-tri-O-bencil-D-ribitol **14** a través de 9 reacciones químicas que están representadas en el esquema siguiente. La Ribosa se transforma en el derivado isopropiliden **6** siguiendo el procedimiento descrito previamente Leonart y col., J. Het. Chem., 1966, 3, 485. Posteriormente se procede a alilar la posición 5 con bromuro de alilo en condiciones de transferencia de fase e hidrolizar el grupo isopropiliden con ácido sulfúrico en metanol para llegar al derivado **8** que es sometido a una reacción de bencilación con cloruro de bencilo e hidruro de sodio en dimetilformamida.



El grupo metilo es hidrolizado con una mezcla de ácido acético y ácido clorhídrico seguido de una reducción con borohidruro de sodio. El derivado 5-O-alil-2,3-di-O-bencil-D-Ribitol **11** se absorbe en silicagel y se extrae selectivamente gracias a un proceso de percolación primero con ciclohexano y luego con cloroformo. Este procedimiento permite la purificación a gran escala sin recurrir a técnicas cromatográficas convencionales. Posteriormente el derivado del ribitol **11** es tritilado con trifenilclorometano en piridina, bencilado con cloruro de bencilo e hidruro de sodio en dimetilformamida y finalmente hidrolizado con ácido acético para llegar al derivado del ribitol final que es purificado por destilación. El derivado del ribitol **14** es ribosilado como se muestra en el siguiente esquema

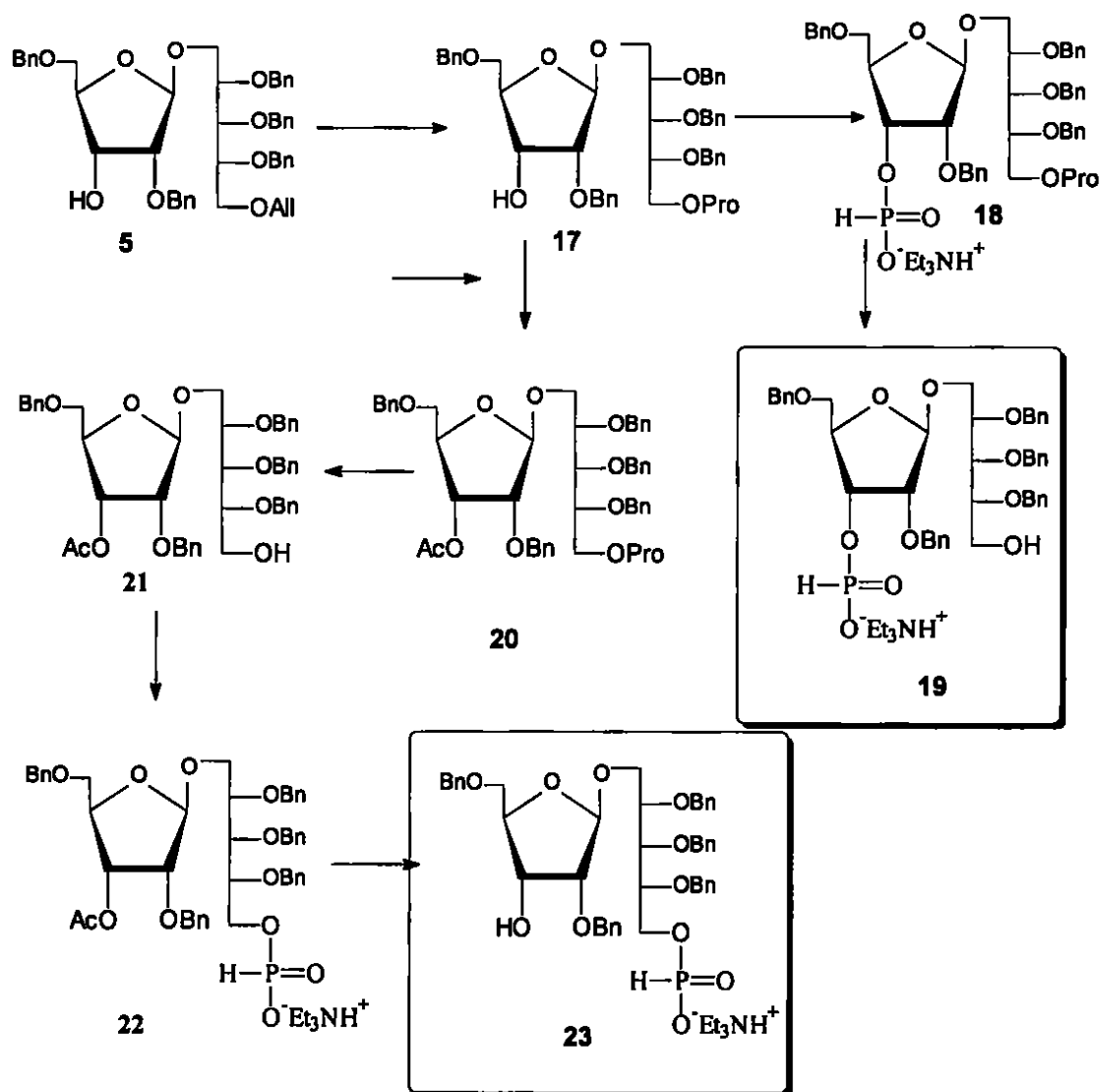
86-13
76

con el derivado de la ribosa peracetilado 15. La desacetilación seguida de una nueva aplicación de la técnica de absorción-desorción permite llegar al triol 4 en gran escala, sin recurrir a etapas cromatográficas.

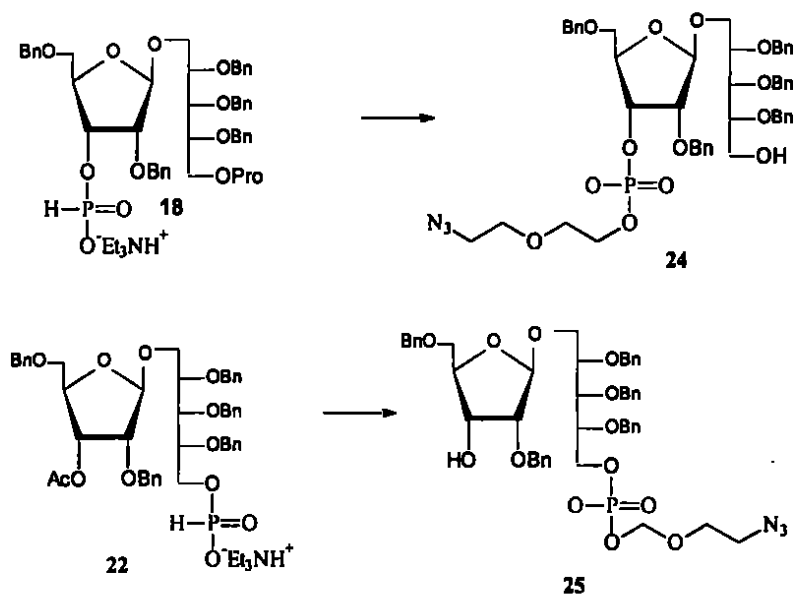


A continuación se aplica sobre este triol 4 la reacción de dibencilación descubierta en el marco de la presente invención y que permite obtener el derivado 5, luego de un proceso de purificación por cromatografía de columna. El grupo alilo del intermediario 5 se isomeriza a grupo propenilo y posteriormente se introduce el fosfonato por la posición 3 libre de la unidad de ribosa para dar luego de la remoción del grupo propenilo el derivado intermediario clave 19. De manera similar, se puede acetilar el grupo hidroxilo de la posición 3 en el derivado 17, hidrolizar el propenilo, posteriormente introducir el fosfonato en la posición 5 y desacetilar el producto para llegar a un disacárido clave 23 que tiene fosfonato en la posición 5 e hidroxilo en la posición 3.

87 14
77



La estructura de los productos formados se confirmó en todos los casos por resonancia magnética nuclear ¹H y ¹³C y por experimentos de correlación H-H y H-X. La pureza fue chequeada por cromatografía de capa delgada o por HPLC.

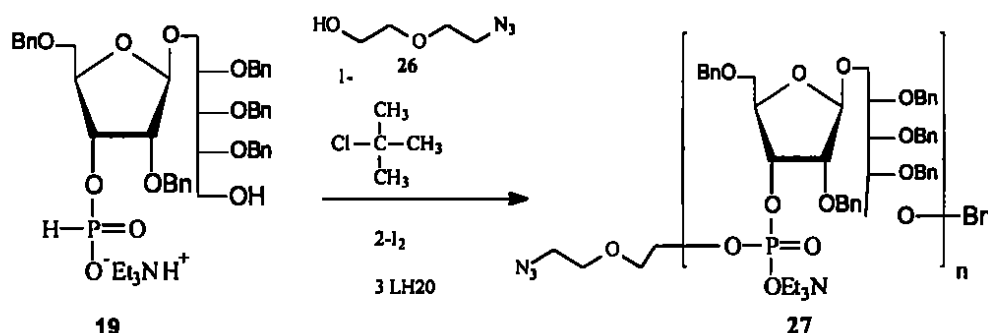


26 18
78

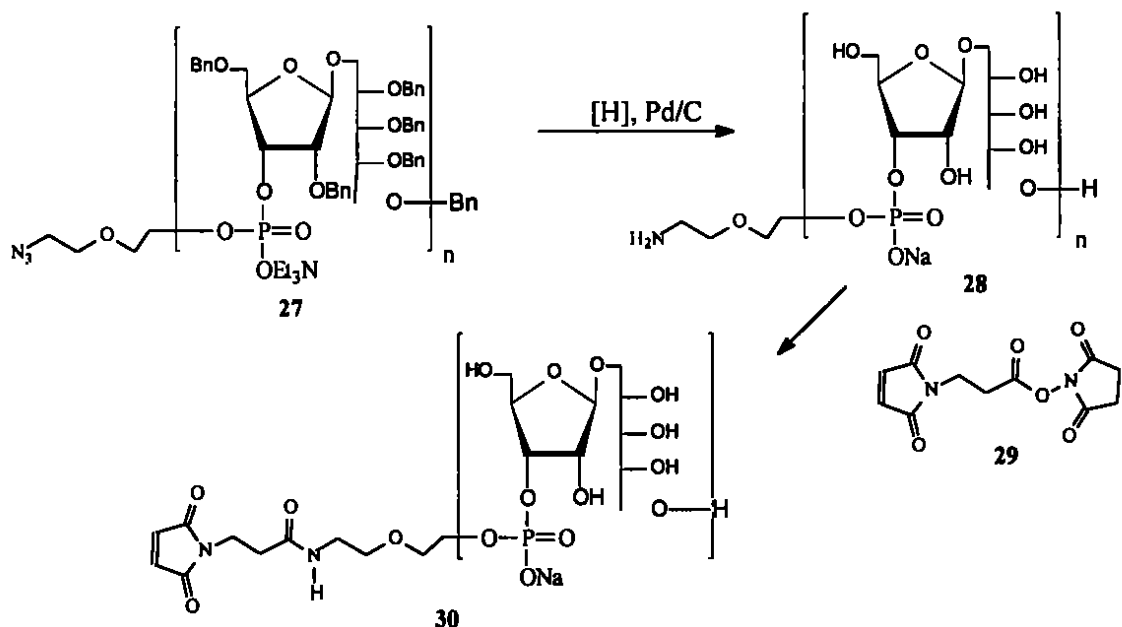
A partir de los derivados 18 o 22 se pueden preparar los derivados 24 y 25 que sirven también como aceptores en la reacción de policondensación como se vera a continuación.

La reacción de oligomerización se estudio bajo diferentes condiciones, siempre sobre la base del uso de solo 3 componentes, un disacárido clave (19 o su análogo 23), un promotor de la reacción que puede ser cloruro de pivaloilo, cloruro de adamantano-1-carbonilo u otro cloruro de ácido impedido estéricamente y un tercer componente que es el encargado de detener la reacción al tiempo que se introduce el espaciador con su grupo funcional activo o su precursor en uno de los extremos que puede ser un compuesto del tipo 24, 25 o 26. En calidad de espaciador que para las sustancias 24, 25 o 26 es el 5-azido-3-oxapentanol, se pueden emplear además cualquiera de los compuestos de formula global R_1-Y-OH , donde Y cadena espaciadora que puede estar formada por: una cadena carbonada alifática que puede tener intercalada una cadena aromática o un número de heteroatomos que pueden oscilar entre 0-5. R_1 grupo funcional en el extremo del espaciador que puede ser un grupo NH_2 , $COOR$, CHO , SH u otro grupo precursor de los mismos.

Las condiciones óptimas del proceso fueron desarrolladas para varios de los casos, por ejemplo con el disacarido 19, el espaciador 5-azido-3-oxa-pentanol 26 y cloruro de pivaloilo, en diclorometano-piridina se obtiene una mezcla que después de ser oxidada y cromatografiada por sephadex LH-20 en metanol permite obtener una fracción de oligomeros 27 con un rendimiento de 70-85% sobre la base del disacárido.

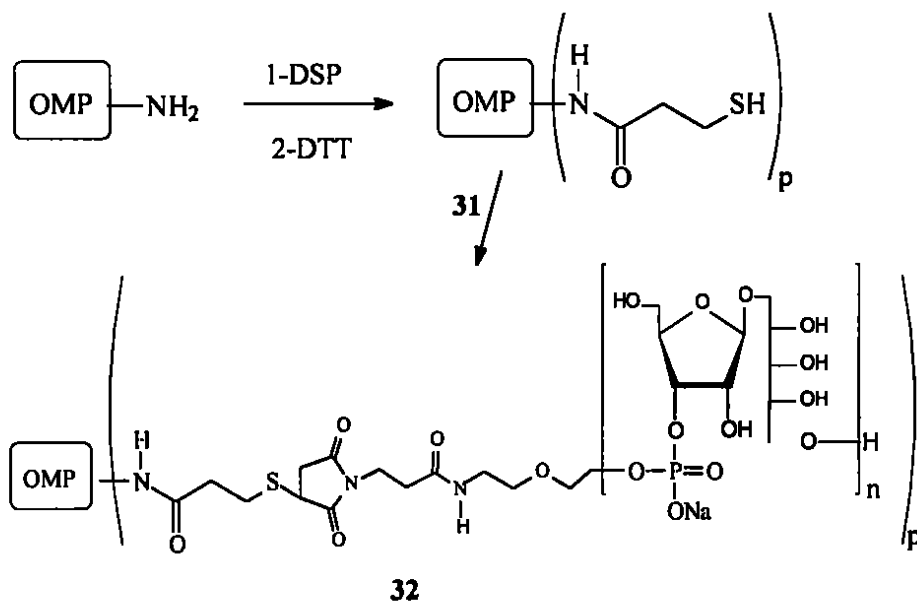


La mezcla de oligosacáridos 27 es hidrogenada en metanol-acetato de etilo-ácido acético-agua en presencia de paladio sobre carbono para dar la mezcla cruda de oligosacáridos 28. Si el grupo del espaciador debe ser activado, el proceso se realiza en la etapa siguiente. Por ejemplo a la mezcla de oligómeros 28 se le adiciona el derivado N-hidroxisuccinimidilo del ácido β -maleimidopropionico en dimetilformamida. Una vez concluida la reacción, el producto se diluye con agua destilada y se ultrafiltra bajo presión de nitrógeno gaseoso a través de una membrana de tamaño de corte 1000. El producto 30, así obtenido constituye la mezcla de oligosacáridos activa, lista para emplear en el proceso de conjugación.



La estructura de los productos formados se confirmó en todos los casos por resonancia magnética nuclear ^1H , ^{13}C y ^{31}P y por experimentos de correlación H-H y H-X.

Las proteínas por su parte son funcionalizadas con ácido tiopropiónico, para lo cual el tior se introduce enmascarado en forma de enlace bisulfuro, a través de reactivos como el SPDP o el DSP seguido de una reacción con ditiotretitol en atmósfera inerte. La separación del exceso de reactivo se puede realizar tanto para la OMP del meningococo como para el toxoide tetánico por precipitaciones con concentraciones de etanol en un rango de 20-95 % seguidas de centrifugación. En el caso de la OMP el proceso que ocurre se ejemplifica en el siguiente esquema.



La proteína tiolada es mezclada en atmósfera inerte con el oligosacárido funcionalizado, previamente filtrado a través de 0.2m y liofilizado. La reacción se detiene por precipitación etanólica seguida de centrifugación o por ultrafiltración.

Alternativamente el exceso de los reactivos activantes, se pueden remover del conjugado por ultrafiltración. Ambos procesos de separación eliminan prácticamente todo el oligosacárido que no se conjuga a la proteína, lo que incrementa y estabiliza la calidad del conjugado.

90 17
80



En ratones balb c, la vacuna preparada a partir de un conjugado similar indujo altos títulos de anticuerpos anti-polisacárido capsular.

La mezcla de oligosacáridos 30 puede ser acoplada a matrices como por ejemplo poliacrilamida y emplearse en la detección de anticuerpos anti-Hib en humanos inmunizados o en animales de laboratorio. La mezcla es posible también acoplarla a un látex y emplearla en la detección de anticuerpos en enfermos y vacunados. La poliacrilamida activada según N. Bovin, Glycoconjugate J., 1998, 15, 431-446 se hace reaccionar con la mezcla de oligosacáridos 30. Se estudio de forma comparativa la capacidad de HbO-HSA que es la sustancia recomendada para la detección de anticuerpos anti-Hib, con el conjugado de 30 y poliacrilamida, observándose en la figura 6 una mejor relación respuesta-ruido del producto con el antígeno sintético.

EJEMPLO N1

Síntesis del 5-O-alil-2,3-di-O-bencil-D-ribitol 11

Alilación.-100g de metil 2,3-O-isopropiliden-D-ribofuranosido se disuelven en 70 mL de bromuro de alilo y se agitan en presencia de 75 mL de hidróxido de sodio acuoso al 50% y 2.6 g de yoduro de tetrabutil amonio durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo la agitación se detiene y las fases se separan. La capa acuosa se extrae con 70 mL de diclorometano y las fases orgánicas reunidas se evaporan y se secan a vacío.

Hidrólisis.- El sirope resultante se disuelve en 1.5 L de metanol. A la solución se le adicionan 3.6 mL de ácido sulfúrico acuoso 0.4 N y la mezcla se refluja por espacio de 3 horas. Una vez concluida la reacción, se neutraliza el ácido con bicarbonato de sodio, se filtran las sales resultantes y la solución es evaporada a vacío. El residuo se extrae con acetato de etilo, se seca y se evapora. El sirope resultante se seca a vacío por espacio de 2 horas.

Bencilación.-Posteriormente se disuelve en 450 mL de dimetilformamida. La solución resultante se enfría a 0°C y se añaden sobre la misma 50 g de hidruro de sodio. La mezcla se agita por espacio de 30 minutos y posteriormente se gotean sobre la misma 150 mL de cloruro de bencilo. Luego de 2 h de agitación se gotea sobre la reacción 20 mL de metanol, la suspensión resultante se evapora a vacío, se redisuelve en diclorometano y se lava con agua. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se evapora.

Hidrólisis.- El sirope resultante de la reacción anterior se disuelve en 1.5 L de dioxano. Se adiciona HCl (2N, 1.5 L) y se calienta el sistema hasta una temperatura 75-80°C. A las 2 horas de reacción se detiene la agitación y separan las fases. La fase acuosa de la reacción se extrae dos veces con 200 mL de diclorometano y las fases orgánicas unidas se rotoevaporan. El producto concentrado se disuelve en 1 litro de diclorometano y se lava sucesivamente con 400 mL de agua, 300 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio, 400 mL de agua, se seca con sulfato de sodio y se rotoevapora.

92 19
82

Reducción.- El sirope resultante se disuelve en etanol (800 mL) se enfría el sistema hasta 20°C y se añaden 24 g NaBH₄. La mezcla reaccionante se agita a temperatura ambiente por espacio de 1.5 h y una vez finalizada la reacción se destruye el exceso de borhidruro con ácido acético hasta que alcance un pH 7-8. Se filtra y la solución resultante se rotoevapora. El residuo se disuelve en 500 mL de diclorometano y la solución orgánica se lava con agua, se seca con sulfato de sodio y se emplea en el ejemplo siguiente.

EJEMPLO 2

Purificación del 5-O-alil-2,3-di-O-bencil-D-ribitol **11**.

A la solución diclorometánica del 5-O-alil-2,3-di-O-bencil-D-ribitol **11** crudo proveniente del ejemplo anterior se añaden 300 g de silicagel. Se agita manualmente el sistema hasta que se absorbe el producto en la fase sólida y se rotoevapora al vacío para eliminar el diclorometano. El producto absorbido en silicagel se coloca en un equipo de percolación. Las impurezas presentes se extraen con ciclohexano por espacio de 48 h. Posteriormente se cambia el solvente a diclorometano y el producto se extrae en forma de sirope amarillo claro cromatográficamente puro. Rendimiento 75-95%. RMN ¹³C δ 60.7 (C -1), 70.2 (C -4), 71.0, 71.7, 72.0, 73.6 (PhCH₂, C -5, OCH₂CH=), 79.2, 79.3 (C -2,3), 117.1 (CH₂=), 127.5-128.2 (Ph), 134.3 (CH=), 138.0, 138.1 (Cipso).

EJEMPLO 3

Síntesis del 5-O-alil-2,3,4-tri-O-bencil-D-ribitol **14**.

Tritilación.- 100 g de 5-O-alil-2,3-di-O-bencil-D-ribitol **11** proveniente del ejemplo anterior se secan a vacío y se disuelven en 600 mL de piridina. Se adicionan 75 mL de trifenilclorometano, 0.5 g de dimetilaminopiridina y la mezcla se agita a 50 °C por espacio de 6 h. Una vez concluida la reacción se rotoevapora y el residuo se disuelve en 500 mL de diclorometano, se lava con 1 L de agua, se seca con sulfato de sodio y se rotoevapora. El residuo se seca a vacío por espacio de 3 horas.

Bencilación.- El sirope del paso anterior se disuelve en 300 mL de dimetilformamida y la solución se enfría a 5 °C. Se adicionan lentamente 25 g de hidruro de sodio y una vez terminada la adición se mantiene la agitación por espacio de 30 minutos. Se gotea entonces 40 mL de cloruro de bencilo y la reacción se mantiene agitando por espacio de 1 h. Una vez concluida la reacción, se enfría y se gotean 10 mL de metanol para destruir el exceso de reactivo, los solventes se rotoevaporan y el residuo resultante se disuelve en 500 mL de

diclorometano, se lavan con 1 L de agua. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se rotoevapora.

Hidrólisis.- El residuo se disuelve en 1 L de ácido acético, se adicionan 110 mL de agua destilada y la reacción se agita 80°C. Después de 1.5 horas, la reacción termina, El solvente se rotoevapora y el residuo se disuelve en 500 mL de ciclohexano, la fase orgánica se enfría a 0 - 5°C por espacio de 4 horas y se filtra. La fase orgánica se lava con agua, se seca con sulfato de sodio y se rotoevapora. El producto se obtiene puro por destilación entre 200-220 °C a 0.1 mm. Rendimiento 80-90 g a partir de 100 g de ribosa. RMN ¹³C δ 61.2 (C-1), 69.6, 71.8, 72.1, 72.3, 73.9 (PhCH₂,C -5, OCH₂CH=), 78.0, 78.8, 78.9(C -2,3,4), 116.8 (CH₂=), 127.5-128.2 (Ph), 134.7 (CH=), 138.0, 138.1, 138.2 (Cipso).

EJEMPLO 4

Síntesis del 5-*O*-Alil-2,3,4-tri-*O*-bencil-1-*O*-(β-D-ribofuranosil)-D-ribitol 4.

Glicosilación.- Se adiciona a un reactor el derivado del ejemplo anterior (370 g) disuelto en 2.7 L de dicloroetano seco. Se enfría el sistema de reacción a 0-25°C, se adicionan tamices moleculares 4Å en polvo (207 g) y tras 15 minutos se adiciona una solución de trifluoreterato de boro (407 mL) a un flujo cercano a los 15 mL/min. Por último se añade el peracetato de ribofuranosa 15 (370 g) disuelto en dicloroetano seco (1 L) en un tiempo aproximado de 20 minutos y se mantiene el sistema reaccionando durante 3 horas. Se chequea el consumo del producto de partida por CCD empleando el sistema de solventes hexano/acetato de etilo (2/1) y se revela con H₂SO_{4(c)} al 5% en etanol. Al terminar la reacción se neutraliza con trietilamina (222 mL) hasta pH 7 y posteriormente se adiciona solución saturada de bicarbonato sodio (800 mL) y se deja agitando por media hora. La reacción debe mantenerse a pH neutro. Se descarga el contenido del reactor y se filtra a vacío. El sólido obtenido se lava 2 veces con dicloroetano (200 mL) para arrastrar el producto retenido en la torta sólida. La fase sólida se desecha y la fase orgánica se extrae dos veces con 600 mL de agua, se seca con sulfato de sodio y se rotoevapora a vacío

Desacetilación - Al sirope resultante de la reacción anterior disuelto en metanol (2 L), se adiciona una solución de metóxido de sodio en metanol (1%) hasta que el pH del medio reaccionante alcance 9. Se mantiene el sistema reaccionando durante casi 2 horas. Al terminar la reacción se neutraliza con resina ácida hasta pH 6-7. La resina se separa por filtración a vacío. El sirope obtenido (427 g) contiene además del producto deseado, 5-*O*-Alil-2,3,4-tri-*O*-bencil-D-ribitol sin reaccionar, D-Ribosa y otras impurezas no determinadas.

94-31
84

EJEMPLO 5

Purificación del 5-O-Alil-2,3,4-tri-O-bencil-1-O-(β-D-ribofuranosil)-D-ribitol 4

El sirope proveniente del ejemplo anterior se disuelve en diclorometano (1 L) y se añade sílicagel (1 kg). Se agita manualmente el sistema hasta que se absorbe el producto en la fase sólida y se rotoevapora al vacío para eliminar el diclorometano. El sólido resultante se mantiene a vacío por espacio de 2 horas para eliminar cualquier traza de diclorometano.

El producto absorbido en sílicagel se coloca en un equipo de percolación. Las impurezas presentes se extraen con ciclohexano por espacio de 48 h. Posteriormente se cambia el solvente a cloroformo y el producto se extrae en forma de sirope amarillo claro cromatográficamente puro. Rendimiento 238 g. RMN ^1H δ 5.85 (m, 1H, CH=), 5.20 (m, 2H, CH₂=), 4.85 (s, 1H, H-1'). ^{13}C δ 62.8 (C-5'), 77.7, 77.9, 78.2 (C-2,3,4), 84.0 (C-4'), 107.2 (C-1').

EJEMPLO 6

Síntesis del 5-O-alil-2,3,4-Tri-O-bencil-1-O-(β-D-2',5'-di-O-bencil-ribofuranosil)-D-ribitol 5

Bencilación.- Se disuelve el derivado resultante del ejemplo anterior (200 g) en tolueno (2 L), se añade Bu₂SnO (80 g) y se refluja durante 4 horas. Se enfría a temperatura ambiente y se añade poco a poco NaH al 50 % (56 g). Se agita a 80°C alrededor de media hora y se añade yoduro de tetrabutilamonio (62 g). Se agita a 80°C alrededor de una hora y se añade entonces el cloruro de bencilo (148 mL). Se continúa la agitación a 80°C y las adiciones de porciones similares de cloruro de bencilo con aproximadamente media hora de intervalo hasta que la CCD (hexano/acetato de etilo - 2/1) muestre que el producto mayoritario en la reacción es el disacárido dibencilado. Se enfría entonces la reacción, se neutraliza con una solución metanólica al 1% de HCl y se filtra a presión reducida usando Celite como ayuda filtrante. Se evapora el tolueno a presión reducida. El producto obtenido con sales de la evaporación se disuelve en acetato de etilo, se filtra a presión reducida y se concentra. El sirope crudo se purifica por cromatografía de columna usando un sistema de solventes tolueno/acetona - 60/1. El producto puro 5 se obtiene como sirope (100 g). RMN- ^1H δ 5.96 (m, 1H, -CH=), 5.18 (m, 2H, CH₂=), 5.02 (s, 1H, H-1)

Ejemplo 7

Síntesis del 2,3,4-Tri-O-bencil-1-O-(β-D-2',5'-di-O-bencil-3'-O-trietilamonio fosfonato-ribofuranosil)-D-ribitol (19).

95-22
85

Isomerización del grupo alilo.-20 g del sirope resultante del ejemplo anterior, se secan a alto vacío por espacio de 2 horas. Se añaden al mismo dimetilsulfoxido seco (100 mL) y t-butoxido de potasio (6.4 g). La reacción se coloca a 100°C por espacio de una hora, y luego se vierte sobre 250 mL de agua helada. Se adiciona ácido clorhídrico conc gota a gota hasta que el pH de la reacción alcanza 7. Se extrae con 3 veces con 80 mL de éter etílico. Las fases orgánicas unificadas se secan con sulfato de sodio y se evaporan.

Fosfonilación.-Se prepara una solución de imidazol (1.5 g) en acetonitrilo seco (34 mL), se enfría a 0°C y se adiciona a la misma tricloruro de fósforo (0.56 mL) y trietilamina 3.1 mL. La solución se agita por espacio de 15 minutos y se adiciona a la misma gota a gota el disacárido resultante del paso anterior disuelto en acetonitrilo (3 mL). La mezcla se agita por espacio de 15 minutos a temperatura ambiente y se detiene la reacción por adición a la misma de solución 1M de bromuro de trietilamonio. Se agita por 10 minutos y se adiciona a la misma diclorometano, se separan las fases y la fase orgánica se lava con solución fría de bromuro de trietilamonio. La fase orgánica lavada, se seca con sulfato de sodio y se evapora. *Hidrólisis del propenilo.*-El producto se disuelve en ácido acético 60% y se agita a 70°C por espacio de 30 minutos, se evapora el solvente y la mezcla se redissuelve en diclorometano y se lava con solución de bromuro de trietilamonio, se seca y se evapora. La cromatografía de columna del sirope resultante permite obtener el producto puro con un rendimiento que oscila entre el 70-85%.

RMN ^1H δ 6.85 (d, H-P), 4.95 (s, H-1), 4.60 (m, H-3), 2.93 (q, NCH_2CH_3) 1.20 (t, NCH_2CH_3). ^{13}C δ 105.9 (C-1).

Ejemplo 8

Reacción de policondensación entre 19 y 26 (relación 10-1)

A una solución del compuesto 19 (1g) en piridina-trietilamina (10-1, 1 mL) se adiciona cloruro de trimetilacetilo (0.14 mL) y la reacción se agita por un intervalo de 20 min. Se adiciona entonces el espaciador 26(14.6 mg) y una nueva cantidad de cloruro de trimetilacetilo (0.9 mL) y la reacción se agita por un nuevo intervalo de 1 h. Se adiciona una solución de I_2 (1.1 g) en piridina-agua (7.3 mL; 20-1) y se agita por espacio de 30 minutos. La reacción se diluye con diclorometano y se lava con solución 1M de tiosulfato de sodio y con una solución fría de bromuro de trietilamonio (0.5 M), se seca con sulfato de sodio y se evapora. El producto se resuspende en metanol y se cromatografía a través de una columna de sephadex LH-20 previamente estabilizada en metanol. Las fracciones correspondientes se reúnen y se evaporan. Rendimiento 80%.

Ejemplo 9

Reacción de policondensación entre **19** y **26** (relación 10-1)

A una solución del compuesto **19** (1g) y el espaciador **26** (14.6 mg) en piridina-trietilamina (10-1, 1 mL) se adiciona cloruro de trimetilacetilo (0.23 mL) y la reacción se agita por un intervalo de 2 h. Se adiciona una solución de I₂ (1.1 g) en piridina-agua (7.3 mL; 20-1) y el producto se trata de manera similar al ejemplo 8.

Ejemplo 10

Reacción de policondensación entre **19** y **26** (relación 5-1)

A una solución del compuesto **19** (1g) y el espaciador **24** (29.2 mg) en piridina-trietilamina (10-1, 1 mL) se adiciona cloruro de trimetilacetilo (0.23 mL) y la reacción se agita por un intervalo de 2 h. Se adiciona una solución de I₂ (1.1 g) en piridina-agua (7.3 mL; 20-1) y el producto se trata de manera similar al ejemplo 8.

Ejemplo 11

Reacción de policondensación entre **23** y **26** (relación 5-1, solvente piridina)

A una solución del compuesto **23** (1g) y el espaciador **26** (29.2 mg) en piridina (1 mL) se adiciona cloruro de trimetilacetilo (0.23 mL) y la reacción se agita por un intervalo de 2 h. Se adiciona una solución de I₂ (1.1 g) en piridina-agua (7.3 mL; 20-1) y el producto se trata de manera similar al ejemplo 8.

Ejemplo 12

Reacción de policondensación entre **19** y **24** (relación 5-1, solvente piridina)

A una solución del compuesto **19** (1g) y el espaciador **24** (29.2 mg) en piridina (1 mL) se adiciona cloruro de trimetilacetilo (0.23 mL) y la reacción se agita por un intervalo de 2 h. Se adiciona una solución de I₂ (1.1 g) en piridina-agua (7.3 mL; 20-1) y el producto se trata de manera similar al ejemplo 8.

Ejemplo 13

El producto crudo de los ejemplos 8-12 es hidrogenado en una mezcla de acetato de etilo-etanol-agua-ácido acético (1-2-2-0.1) con Paladio al 10 % sobre Carbono y finalmente se purifica por intercambio iónico a través de sephadex C-25 Na. El liofilizado caracterizado por RMN muestra que el producto contiene la unidad repetitiva Rib-Rib-fosfato y el espaciador. Las fracciones activas se obtienen por dos ultrafiltraciones, primero a través de una membrana de intervalo de corte 1000 y lo retenido se ultrafiltra por 10 000. Lo que pasa a través de la membrana se liofiliza dando el producto final **28** con un rendimiento global que oscila en dependencia de las condiciones seleccionadas entre 20-80% con respecto al disacárido de partida. RMN ¹H δ 5.12 (H-1), 4.60 (H-3), 3.29 (CH₂NH₂). ³¹P δ 2.14 (espac-P-Rib) 0.74 (Ribitol-P-Rib).

24
87

Ejemplo 14

Síntesis del derivado 5-(3-maleimidopropionamido)-3-oxapentil oligo ribosil ribitol fosfato **30**.

A una solución del producto del ejemplo anterior (3.34 mg, 1.73 μ mol) en agua bidestilada (0.1 mL), se le adicionó 0.7 mg (2.62 μ mol) de N-hidroxisuccinimidil β -maleimidopropionato **27** disuelto en N,N-dimetilformamida (0.4 mL). Después de 4 h de reacción, la solución se evaporó a vacío y se resuspendió en agua destilada (0.5 mL), se centrifugó (10 min., 3500 rpm) y el sobrenadante se diluyó con agua bidestilada y se ultrafiltró en un equipo Amicon a través de una membrana de valor de corte 1000. Lo retenido en la membrana se liofilizó. El rendimiento oscila entre 85 y 95 %. RMN: ^1H , δ 6.95 (s, 2H, CH=CH), 5.01 (s, H-1) 3.41 (t, 2H, CH₂NH), 2.56 (t, 2H, CH₂a).

Ejemplo 15

Los productos de los ejemplos 8-12 hidrogenados y en forma de sal de sodio son analizados por cromatografía de intercambio iónico en una columna HR 5/5 de Mono Q, con un gradiente lineal de cloruro de sodio P. Constantino, y col., Vaccine 1999, 17, 1251-1263. El perfil cromatográfico de elución representado en la figura 1B muestra que la mezcla de oligosacáridos del ejemplo 8 contiene fragmentos de diferentes tallas. Si se compara lo reportado en la literatura y el cromatograma A de un pentámero se puede concluir que en la mezcla están representados desde 4-5 unidades repetitivas hasta mas de 20.

Ejemplo 16

Conjugación con las proteínas de la membrana externa del meningococo.

Se disuelve la masa de proteína de la membrana externa del meningococo (OMP) de un frasco que contiene aproximadamente 400 mg de proteína en 80 mL del PBS burbujeado en con N_{2(g)}. Se destapa y se burbujea la solución de OMP en PBS de pH 8 con N₂ (g) por 5 minutos, manteniendo la agitación y en baño de agua con hielo. Se adiciona 1.6 mL de la solución de DSP en DMP y se agita lentamente a 4°C por 2 h. Se adiciona 1.6 mL de solución de DTT en PBS- y se agita lentamente a 4°C el frasco bien tapado por 1 h. Se Trasvasa la solución sobre un frasco con 20-400 mL de etanol frío y se centrifuga. Se decanta el sobrenadante. Se resuspende en una pequeña porción de etanol y luego se adicionan entre 200-400 mL de etanol. Se centrifuga de nuevo. Se resuspende la torta obtenida en 80 mL de PBS pH = 7-9 Se añade una solución del oligosacárido sintético funcionalizado **30** y se agita por espacio de 1-48 hr. Una vez concluido el proceso se repiten las operaciones de precipitación etanólica-centrifugación seguido de una ultrafiltración por una membrana de 30

000 y finalmente se reconstituye en el buffer de PBS a una concentración antígeno sintético de 40-80 µg por mL.

Ejemplo 17

Conjugación con toxoide tetánico.

La solución de toxoide tetánico a una concentración de 5 mg/mL en PBS de pH 8 se burbujea con N_{2(g)} por 5 minutos, manteniendo la agitación y en baño de agua con hielo. Se adiciona 1.6 mL de la solución de DSP en DMP y se agita lentamente a 4°C por 2 h. Se adiciona 1.6 mL de solución de DTT en PBS- y se agita lentamente a 4 °C el frasco bien tapado por 1 h. Se Trasvasa la solución a un equipo de ultrafiltración con membrana de 10000, se ultrafiltra adicionando buffer fresco, previamente burbujeado con N_{2(g)} a lo retenido en la membrana, hasta que la solución de lo que pasa por la membrana es negativa al test de Ellman para tioles. Se añade una solución del oligosacárido sintético funcionalizado 30 y se agita por espacio de 1-48 h. Una vez concluido el proceso se repiten las operaciones de ultrafiltración por membrana de 10000 hasta que la solución de lo que pasa por la membrana es negativa al test de fenol-sulfúrico para azúcares. Finalmente se reconstituye en el buffer de PBS a una concentración de antígeno sintético de 40-80 µg por mL.

Ejemplo 18

Conjugación a dioctadecil glicerina hemisuccinato.

El producto del ejemplo 8(10mg) se disuelve en 1 mL de dimetilformamida se mezcla con una solución del hemisuccinato dioctadecil glicerina activado en forma de N-hidroxisuccinimidilo 31. Se añaden etil diaminopropilcarbodiimida (5 mg) y la reacción se agita por espacio de 6h. Se añade una nueva porción de carbodiimida y la reacción se continua con agitación por espacio de 6 h. El solvente se evapora y la mezcla se aplica a una columna de C18-silicagel (1g). Se eluye con agua para remover el oligosacárido y finalmente con una concentración creciente de metanol-agua para eluir el producto de la reacción. Rendimiento 85%. RMN ¹H δ 5.12 (H-1), 4.60 (H-3), 3.40 (CH₂NH), 1.30 (CH₂), 0.90 (CH₃).

Ejemplo 19

Preparación de la vacuna sin adyuvante.

El inmunógeno obtenido en el ejemplo 16 que se encuentra disuelto en buffer de PBS a una concentración de 40 µg por mL se diluye en condiciones asépticas y a 4-8 °C con una solución de agua bidestilada. Se agita durante 10 min. Se determina la concentración del antígeno de Hib y de las proteínas por ensayos colorimétricos y se ajusta añadiendo más buffer de PBS a una concentración final del antígeno de Hib de 20 mg/mL. Se añade tiomersal hasta una concentración final de 0.1-0.001 %. La suspensión resultante constituye el granel de una vacuna conjugada contra Hib sin adyuvante.

99 26
89

Ejemplo 20

Preparación de la vacuna con alumina como adyuvante.

El inmunógeno obtenido en el ejemplo 16 que se encuentra disuelto en buffer de PBS a una concentración de 40 µg por mL se mezcla en condiciones asépticas y a 4-8 °C con una solución de alumina 1-0.01mg por mL en agua bidestilada. Se agita durante 20 min. Se determina la concentración del antígeno de Hib y de la proteínas por ensayos colorimétricos y se ajusta añadiendo mas buffer de PBS a una concentración final del antígeno de Hib de 20 mg/mL. Se añade tiomersal hasta una concentración final de 0.1-0.001 %. La suspensión resultante constituye el granel de una vacuna conjugada contra Hib con adyuvante de alumina.

Ejemplo 21

Preparación de una vacuna combinada anti-Hib y antimeningococica B.

El inmunógeno obtenido en el ejemplo 16 que se encuentra disuelto en buffer de PBS a una concentración de 80 µg por mL que tiene una proporción oligosacárido-proteína entre 1-3 y 1-5, se mezcla en condiciones asépticas y a 4-6 °C con una solución de proteínas de la membrana externa del meningococo B de la empleadas en la producción de VA MENGOC BC, a una concentración en PBS de 100-200 mg por mL. Luego de 20 min de homogeneización por agitación magnética suave, el contenido de la reacción se mezcla con igual volumen de solución de alumina 1-0.01mg por mL en agua bidestilada. Se agita durante 20 min a 4-6 °C. Se determina la concentración del antígeno de Hib por estimación de ribosa y de la proteínas por Lowry y se ajusta añadiendo mas buffer de PBS a una concentración final del antígeno de Hib de 20 mg/mL. Se añade tiomersal hasta una concentración final de 0.1-0.001 %. La suspensión resultante constituye el granel de una vacuna combinada anti-Hib y antimeningococica B adyuvada en alumina.

Ejemplo 22

Preparación de una vacuna combinada anti-Hib y anti-DTP.

El inmunógeno obtenido en el ejemplo 16 que se encuentra disuelto en buffer de PBS a una concentración de 80 µg por m, se mezcla en condiciones asépticas y a 4-6 °C con una solución de granel final de la vacuna triple bacteriana que se encuentra a una concentración cuatro veces superior a la usualmente empleada en la formulación final. Luego de 20 min de homogeneización por agitación magnética suave, el contenido de la reacción se mezcla con igual volumen de solución de alumina 1-0.01mg por mL en agua bidestilada. Se agita durante 20 min a 4-6 °C. Se determina la concentración del antígeno de Hib por estimación de ribosa y de la proteínas totales por Lowry y se ajusta añadiendo mas buffer de PBS a una concentración final del antígeno de Hib de 20 mg/mL. Se añade tiomersal hasta una

concentración final de 0.1-0.001 %. La suspensión resultante constituye el granel de una vacuna combinada anti-Hib y anti-DTP adyuvada en alúmina.

100 27
90

Ejemplo 23

Ensayos inmunológicos de la vacuna obtenida a partir del oligomero y la OMP.

La vacuna de los ejemplos 19 y 20 se inmunizó a una dosis de 1 µg o 2 µg de antígeno. Los animales usados en este trabajo fueron conejos, ratas y ratones. Se realizaron 2 inmunizaciones con 4 semanas de intervalo y 3 extracciones de sangre para todos los experimentos a 0, 28 y 42 días. Después de recogidas las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 20 minutos. Los sueros así obtenidos se diluyeron 10 veces y se almacenaron a -40°C hasta el momento de su testaje.

La evaluación de la respuesta de anticuerpos, de los sueros de todos los animales inmunizados, se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA indirecto. Los resultados se muestran en las figuras 2-5.

Ejemplo 24

Conjugado de la mezcla de oligosacáridos sintéticos y p-nitrofenilacrilato

La mezcla de oligosacáridos del ejemplo 13 (10mg) se disuelve en dimetilformamida y se adiciona sobre una solución de p-nitrofenilacrilato (10-30mg) en dimetilformamida (1mL). Se adicionan 0.1-0.5 mL de trietilamina y la reacción se mantiene con agitación por espacio de 16 h. Se adiciona a la misma 0.1-0.5 mL de amoníaco y la agitación se continua por espacio de 24h. La solución se aplica a una columna de sephadex LH-20 en acetonitrilo. Se eluye con una mezcla de acetonitrilo-agua. Las fracciones positivas a ribosa por el ensayo de orcinol se reúnen y se liofilizan. El rendimiento es superior al 80%.

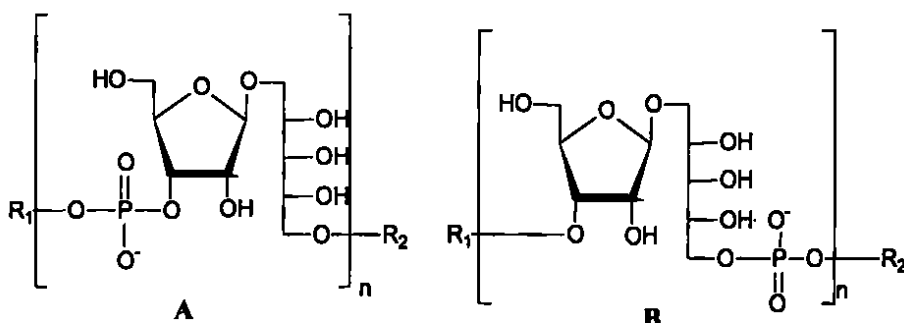
Ejemplo 25

Capacidad del conjugado del oligosacárido sintético de detectar anticuerpos anti-Hib .

Una solución del producto del ejemplo anterior en buffer carbonato-bicarbonato se aplica a una concentración de 1-100 µg por mL sobre la mitad de una placa de 96 pozos. En la otra mitad se aplica el antígeno HbO-HSA a la concentración recomendada. Se procede a realizar un ensayo del tipo ELISA empleando como suero anti-Hib, el suero de ratones inmunizados con un conjugado del polisacárido natural conjugado a toxoide tetánico. Los resultados se muestran en la figura 6.

Reivindicaciones:

1. Mezclas de Oligosacáridos que comprenden las unidades repetitivas (fosfato-ribosa-ribitol) n o (ribosa-ribitol-fosfato) n que se caracteriza por ser obtenida por síntesis en forma de mezclas y por estar compuesta por una serie 4,5,6,7,8,...24,25 de sustancias que comprenden componentes < 8 y > 8 que difieren entre si solo por n donde $n \geq 4$ y ≤ 25 .
2. Mezclas de oligosacáridos de la reivindicación 1, caracterizados por su estructura que responde a las formulas A o B donde R_1 o R_2 es un espaciador para la conjugación a el carrier con la condición que $R_1 = \text{espaciador}$ si $R_2 = \text{H}$, o $R_2 = \text{espaciador}$ si $R_1 = \text{H}$:



3. Mezcla de oligosacáridos de acuerdo a las reivindicaciones 1 y 2 que se caracteriza por ser obtenida por síntesis como una mezcla homogénea donde los componentes individuales difieren entre si solo por n .
4. Mezcla de oligosacáridos de acuerdo a la reivindicación 1-3 donde espaciador significa cualquier cadena hidrocarbonada alifática que contiene intercalados un número de heteroátomos entre 0-5 y/o una cadena aromática. Por el otro extremo el espaciador tiene un grupo funcional NH_2 , COOR , CHO , SH o uno de sus precursores, capaz de formar el enlace químico con el carrier.
5. Procedimiento para sintetizar la mezcla de oligosacáridos de las reivindicaciones 1-4 que se caracteriza por una reacción de policondensación de una sola etapa aplicada al derivado disacárido 19 o 23 en presencia de un promotor que puede ser un derivado activado de un ácido impedido estéricamente, en un solvente básico, y con un espaciador que interviene en la reacción como aceptor deteniendo el crecimiento de la cadena del oligómero.
6. Procedimiento de la reivindicación anterior que se caracteriza por el disacárido intermedio 19 o 23 y el espaciador se encuentran en una proporción molar entre 5-10/1.
7. Procedimiento de la reivindicación 5-6 caracterizado porque el promotor es preferentemente cloruro de pivaloilo, pero puede ser cloruro de adamantilo o un derivado activado de un ácido fosfórico.
8. Procedimiento de la reivindicación 5-7 caracterizado porque el disacárido es 19, el espaciador es 24, el promotor es cloruro de pivaloilo y el solvente es piridina.

- 107 29
92
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5-8 que además comprende las etapas de oxidación del fosfonato a fosfato, seguido de hidrogenación para remover los grupos protectores bencilo, desprotección y/o activación del espaciador y eliminación de las fracciones de <4 o >25 unidades repetitivas por uno o varios procesos de tamizaje o corte molecular.
 10. Inmunógenos que contienen la mezcla de oligosacáridos de las reivindicaciones 1-4, cuya mezcla oligosacáridica esta asociada a un carrier tal como proteínas, péptidos o lípidos.
 11. Vacunas que contienen los inmunógenos de la reivindicación 9 formulados con o sin adjuvante u otros aditivos, para la prevención de las enfermedades infecciosas provocadas por el *Haemophilus influenzae* tipo b
 12. Vacunas que contienen los inmunógenos de la reivindicación 9 o la vacuna de la reivindicación 10 en combinación con otras vacunas tales como la anti-hepatitis b, anti-meningococo A, B, y/o C, DPT, anti-polio, anti-neumococo. 1, 5, 6B, 6A, 14, 19F, 19A y/o 23F o sus respectivos inmunógenos.
 13. Método para la preparación de 2,3,4-tri-O-bencil-5-O-alil-(β -D-ribofuranosil)-D-ribitol 4 en forma pura por ribosilación del 2,3,4-tri-O-bencil-5-O-alil-D-ribitol 14 con peracetato de ribofurano seguido de desacetilación para dar lugar al compuesto 4 que se somete a purificación por adsorción-desorción del citado compuesto 4 en silicagel.
 14. Disacárido 5-O-propenil-2,3,4-tri-O-bencil-1-O-(2',5'-di-O-bencil- β -D-ribo-furanosil)-D-ribitol 17 como intermedio en la síntesis de los derivados 19 y 23.
 15. Método para sintetizar el disacárido intermedio 17 que comprende un procedimiento de dibencilación del disacárido 4 con oxido de dibutilestaño, yoduro de tetrabutilamonio, hidruro de sodio y cloruro de bencilo en una relación 1: 0.5-2: 0.001-1, 0.5-10: 1-5, en un solvente como tolueno, benceno, tetrahidrofurano o xileno, para dar lugar al compuesto de formula 5, seguido de isomerización del alilo a propenilo.
 16. Derivados disacáridicos 2,3,4-tri-O-bencil-1-O-(2',5'-di-O-bencil- β -D-ribo-furanosil)-D-ribitol-5-O-fosfonato de trietilamonio 23 y 2,3,4-tri-O-bencil-1-O-(2',5'-di-O-bencil- β -D-ribo-furanosil)-D-ribitol-3'-O-fosfonato de trietilamonio 19 como intermedios claves en la reacción de oligomerización de la reivindicación 5-7.
 17. Método para preparar los disacáridos 19 o 23 a partir del disacárido 17, que comprende un procedimiento de fosfonilación con tricloruro de fosforo-imidazol seguido de hidrólisis del propenilo, o acetilación, hidrólisis del propenilo, fosfonilación con tricloruro de fosforo-imidazol seguido de desacetilación.
 18. Uso de los disacáridos 19 o 23 para la síntesis de los oligosacáridos de las reivindicaciones 1-4

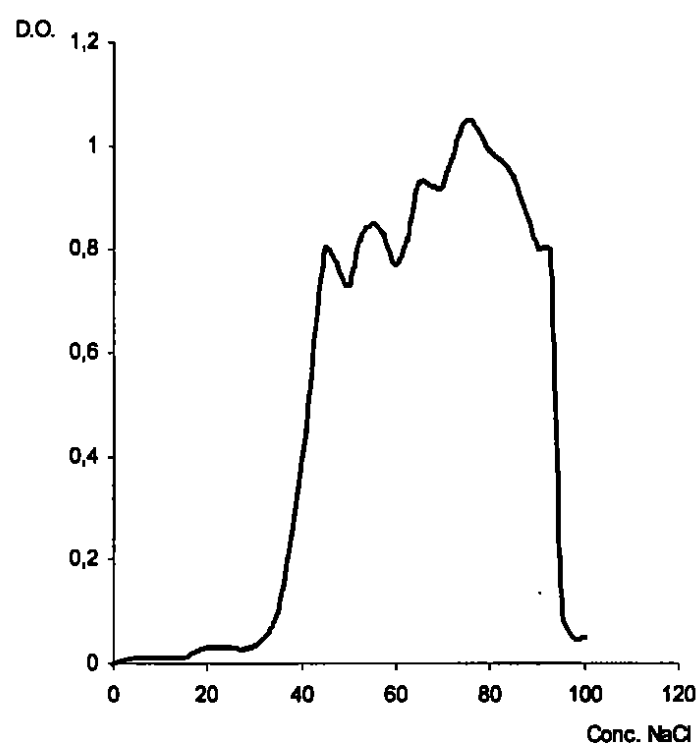
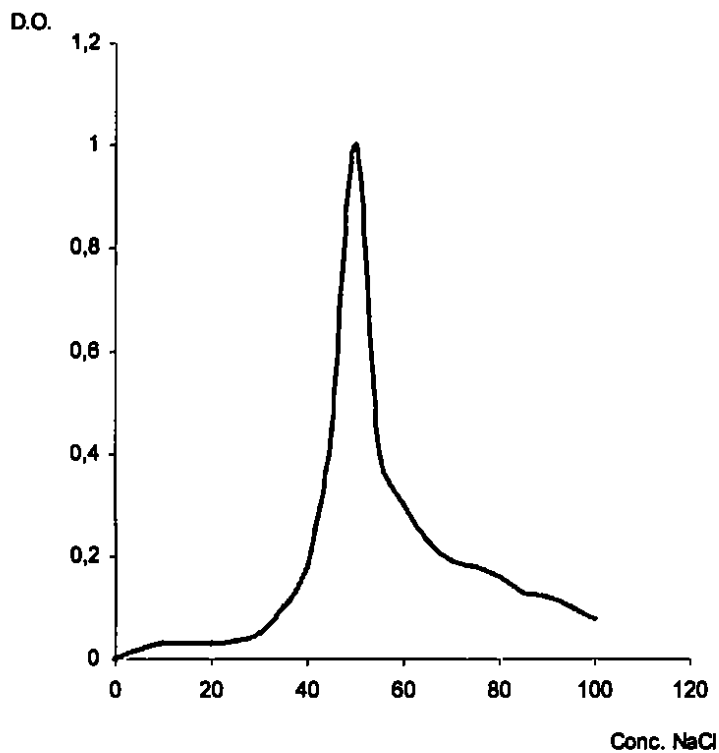
~~103~~ ~~30~~
93

19. Macromoléculas que contienen la mezcla de oligosacáridos de las reivindicaciones 1-8, cuya mezcla oligosacarídica esta asociada a un material polimérico inmunológicamente inerte.
20. Método para la detección y cuantificación de anticuerpos anti-polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* type b que consisten en el uso de las macromoléculas de la reivindicación 16.

103

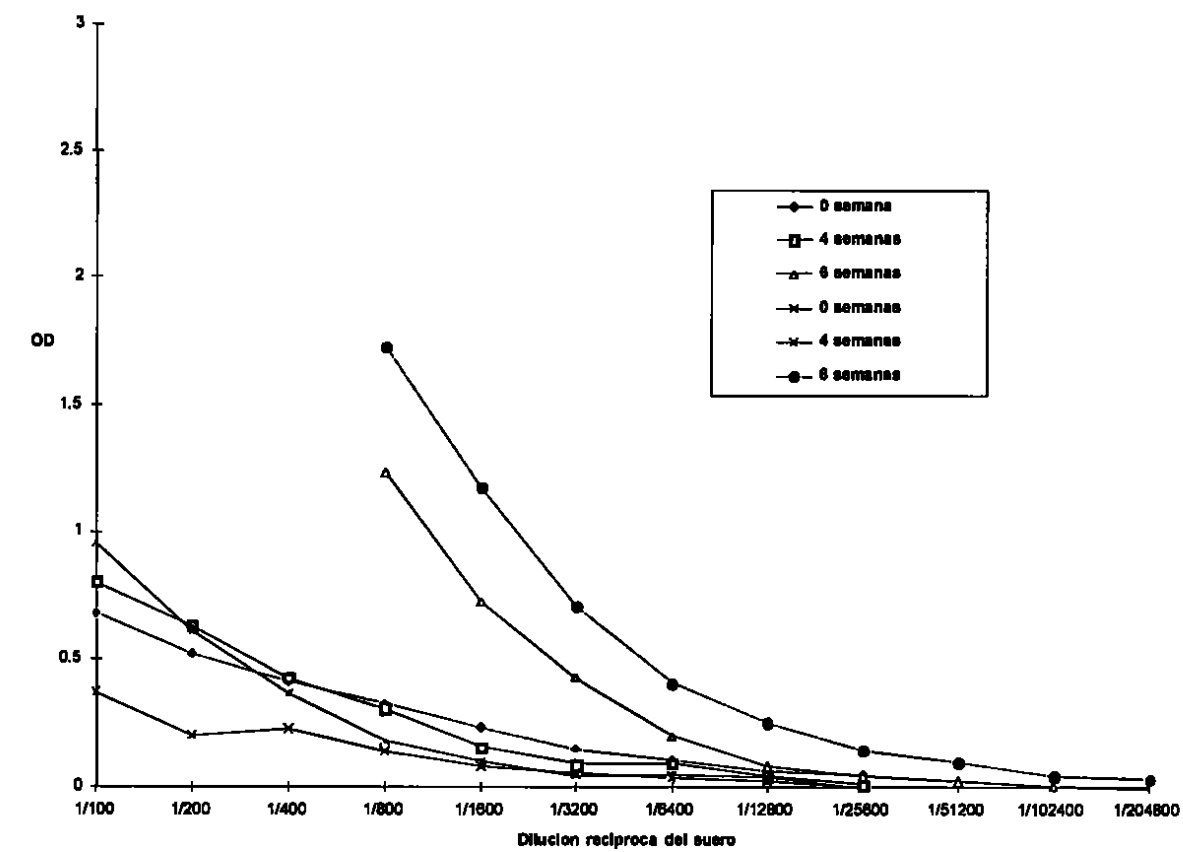
104 31
94

Figura 1
Cromatograma típico de las fracciones de oligomeros obtenidas en el ejemplo 15 por cromatografía de intercambio ionico en Mono Q HR 5/5 co un gradiente lineal de NaCl de 0-500 mM.
A-pentamero; B-Oligomero del ejemplo 10



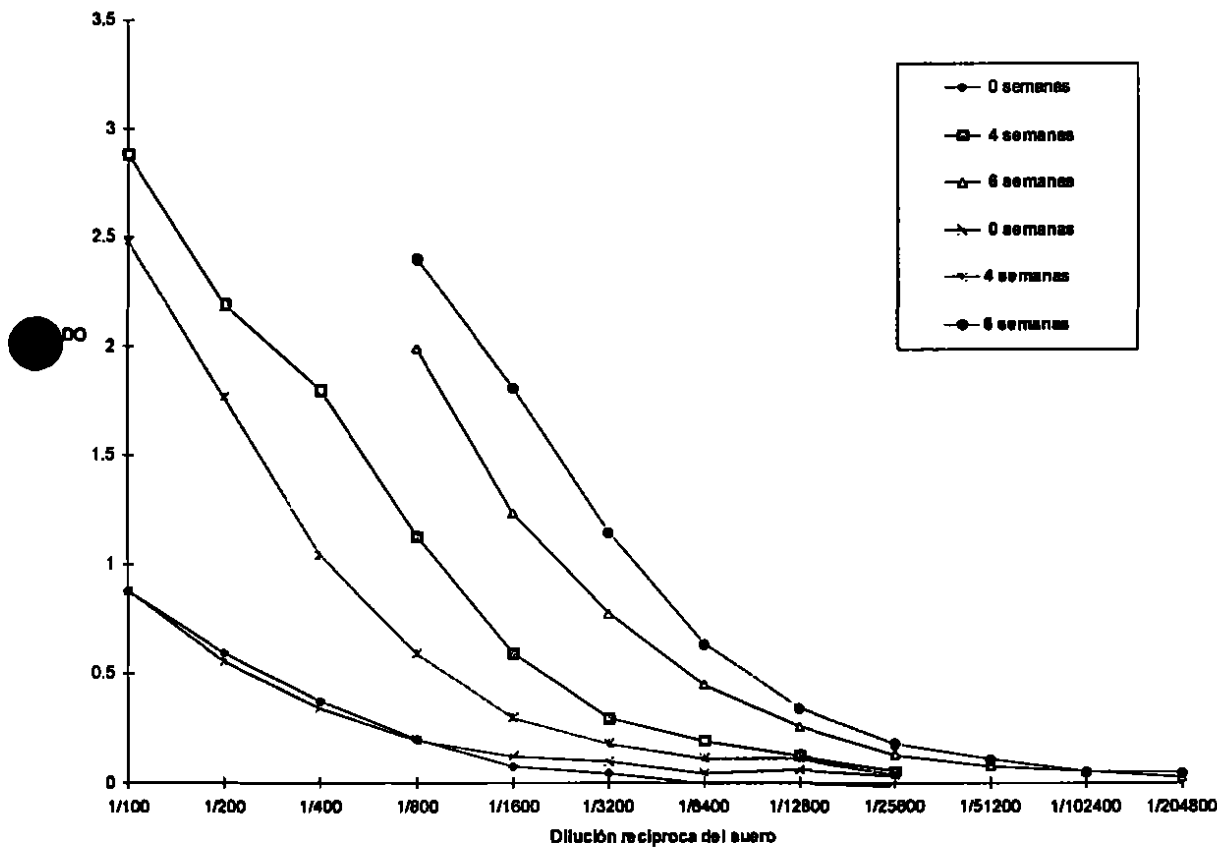
105-32
as

Figura 2
Respuesta de anticuerpos de conejos inmunizados con la vacuna del ejemplo 16



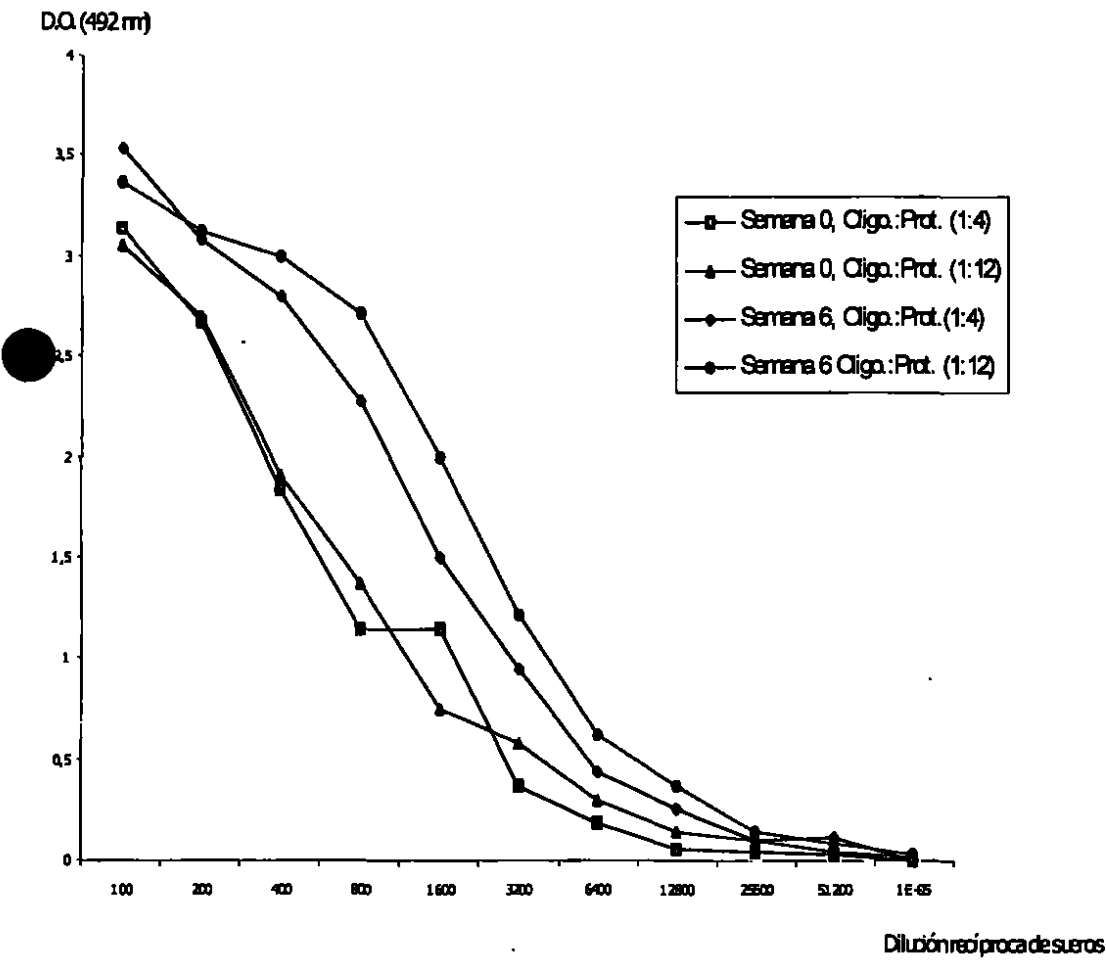
106 33
96

Figura 3
Respuesta de anticuerpos de conejos inmunizados con la vacuna del ejemplo 15



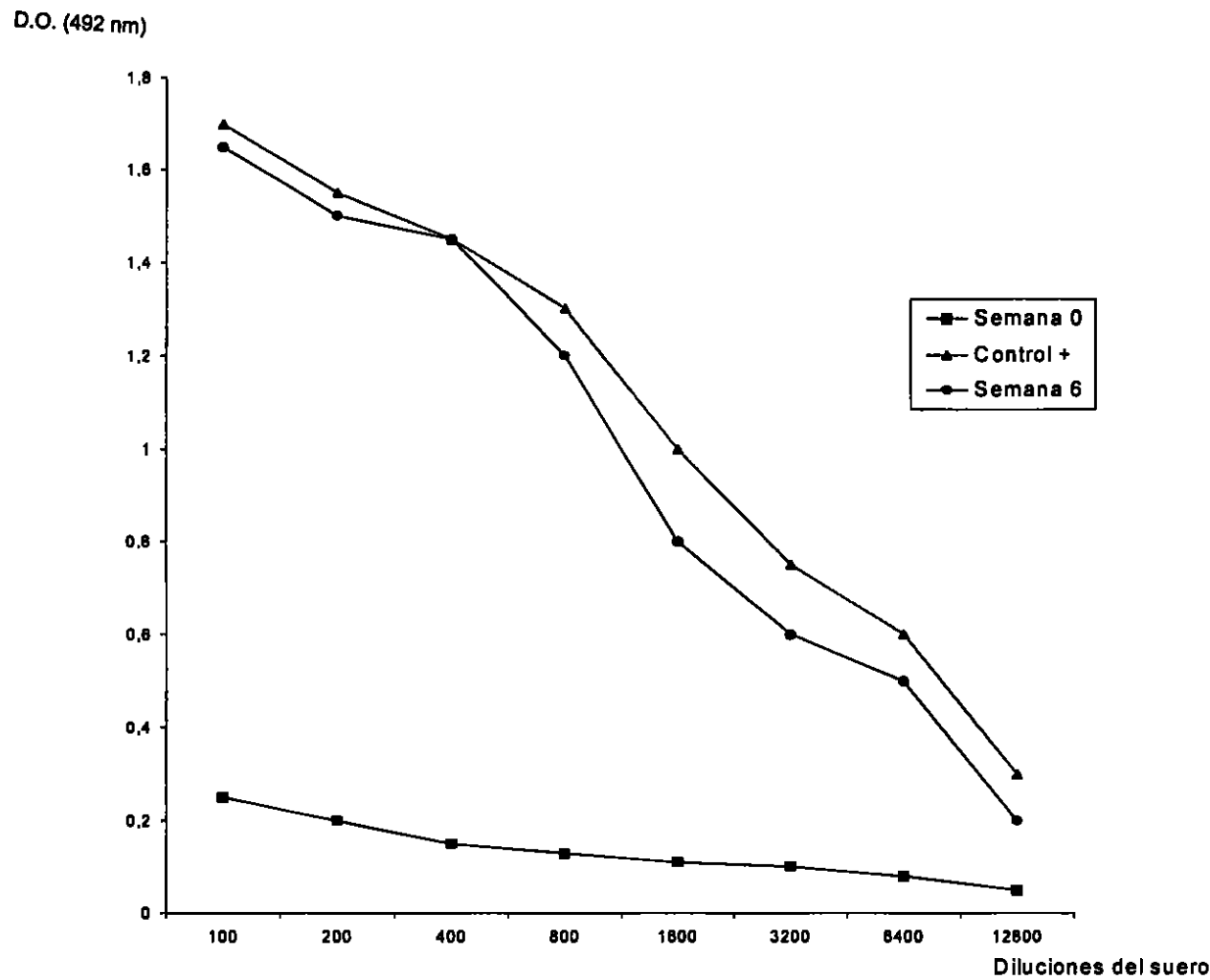
107 34
97

Figura 4
Respuesta de anticuerpos de Ratas inmunizadas con la vacuna del ejemplo 15



108
98 35

Figura 5
Respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados con la vacuna del ejemplo 15



109 75
99

Figura 6
Capacidad del conjugado de 26-PAA para detectar anticuerpos anti-Hib

