



SIC INSTITUTO
DE PATENTES
Y MARCAS
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



**CITUD DE
ENTE DE
ENCION**

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00064095 00000000 Folios: 59
Fecha (AMD): 2000-08-28 14:49:59
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombre y Apellidos o Razón Social

UNIVERSIDAD DE LA HABANA, Y

(MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR) UNIVERSIDAD DE OTTAWA.

(MODIFICACION DE SOLICITANTE VER FL 64 y 55)

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

CUBA

Departamento o Estado

Ciudad

La Habana 10400

Dirección

San Lázaro y L, Plaza de la Revolución

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

Dirección

CARRERA 9 No. 93-09, BOGOTA

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

1. Verez Bencomo, Vicente Guillermo

2. Roy, René

Dirección y Domicilio

1. Soledad No. 615 entre Salud y Jesús Peregrino

Centro Habana, Ciudad de la Habana 10300 - CUBA

Identificación

2. 868 Ave du Cheval Blanc, Gatineau, QC, Canada J8R1A2

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCIÓN

(54) Título de la Invención

" OLIGOSACARIDOS DERIVADOS DE RIBOSA-RIBITOL-FOSFATO

Y VACUNAS QUE LOS CONTIENEN "

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI

☒

NO

☐

(33) País

CUBA

(32) Fecha

30/08/99

(31) No. Solicitud

CU 121/99

SE REIVINDICA EXPRESAMENTE LA PRIORIDAD DERIVADA DE ESTA SOLICITUD, DE CONFORMIDAD CON EL ART. 4° DEL CONVENIO DE PARÍS, VIGENTE EN LA LEY 178 DEL 28 DE DICIEMBRE DE 1994.

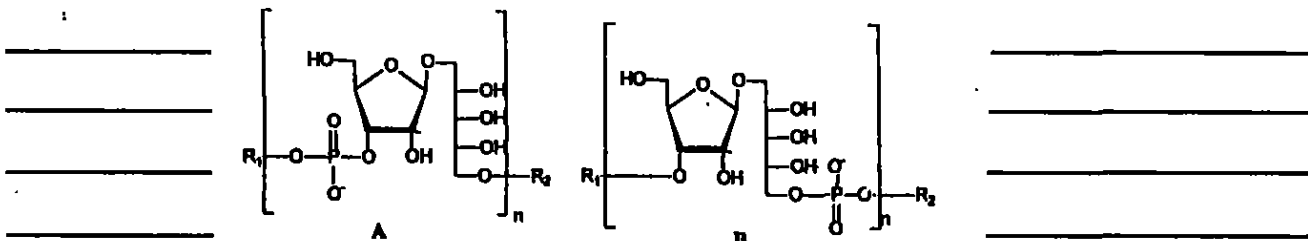
(51) CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 31/6615, 31/7028 (7)

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina, en particular con la síntesis química de mezclas de oligosacáridos derivados de ribosa-ribitol-fosfato, las cuales son empleadas como principio activo en vacunas para la prevención de infecciones causadas por Haemophilus influenzae tipo b (Hib), así como con las vacunas que comprenden dicha mezcla de oligosacáridos.

Las mezclas de oligosacáridos obtenidas por síntesis química de la presente invención, comprenden unidades repetitivas de fórmula (fosfato-ribosa-ribitol)_n o (ribosa-ribitol-fosfato)_n de al menos 5 compuestos de estructura A ó B, las cuales representan la unidad repetitiva del polisacárido capsular del Haemophilus influenzae tipo b y difieren sólo por n, siendo $n \geq 4$ y $n \leq 25$, y donde R₁ ó R₂ es un espaciador para la conjugación a un carrier, con la condición que R₁=espaciador si R₂=H, ó R₂=espaciador si R₁=H:



La invención también se relaciona con los inmunógenos que contienen estas mezclas oligosacáridicas, con las vacunas que contienen esos inmunógenos y con los métodos para preparar estos oligosacáridos en forma de

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☐
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la S.I.C.	☐
Recibo de la tasa respectiva	☒
Si reivindica prioridad, el certificado respectivo (copia legalizada)	☐
Traducción oficial	☐
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☒
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para resumen o para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD


 FIRMA DEL APODERADO

28 AGO. 2000

CC.39 '779.654 Usaquen

T.P.A No. 70819 del Consejo
 Superior de la Judicatura

mezclas. Además, la invención contempla el uso de las vacunas ya sean solas o en combinación con otras vacunas para la prevención de las infecciones causadas por el *Haemophilus influenzae* tipo b.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicacion : 00064095 00000000

Folios: 59

Fecha (AMB): 2000-08-28 14:49:59

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 50,509
FECHA : AGOSTO 14 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
TERESA ESPINOSA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	2246487	2,147,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.



Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

5

MEMORIA DESCRIPTIVA

DE LA

PATENTE DE INVENCION

SOBRE

**“ OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE RIBOSA-RIBITOL-
FOSFATO Y VACUNAS QUE LOS CONTIENEN ”**

PRIORIDAD CUBANA No. 121/99

DE: 30/ Agosto/ 1999

**SOLICITADA POR : UNIVERSIDAD DE LA HABANA,
MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR**

**DOMICILIO : San Lázaro y L, Plaza de la Revolución,
Ciudad de la Habana 10400 - CUBA**

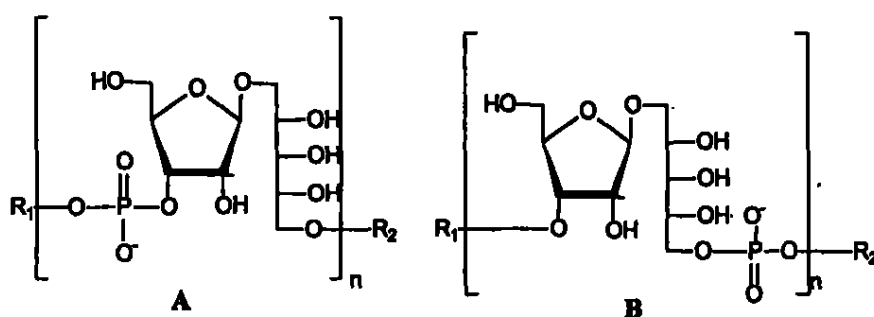
APODERADA: DRA.: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

SANTA FE DE BOGOTÁ, D.C.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con el campo de la Medicina, en particular con la síntesis química de mezclas de oligosacáridos derivados de ribosa-ribitol-fosfato, las cuales son empleadas como principio activo en vacunas para la prevención de infecciones causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), así como con las vacunas que comprenden dicha mezcla de oligosacáridos.

Las mezclas de oligosacáridos obtenidas por síntesis química de la presente invención, comprenden unidades repetitivas de fórmula (fosfato-ribosa-ribitol)_n o (ribosa-ribitol-fosfato)_n de al menos 5 compuestos de estructura A ó B, las cuales representan la unidad repetitiva del polisacárido capsular del *Haemophilus influenzae* tipo b y difieren sólo por n, siendo n = 4 y = 25, y donde R₁ ó R₂ es un espaciador para la conjugación a un carrier, con la condición que R₁ = espaciador si R₂ = H, ó R₂ = espaciador si R₁ = H:



La invención también se relaciona con los inmunógenos que contienen estas mezclas oligosacarídicas, con las vacunas que contienen esos inmunógenos y con los métodos para preparar estos oligosacáridos en forma de mezclas. Además, la invención contempla el uso de las vacunas ya sean solas o en combinación con otras vacunas para la prevención de las infecciones causadas por el *Haemophilus influenzae* tipo b.

LIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE RIBOSA-RIBITOL-FOSFATO Y VACUNAS QUE LOS CONTIENEN.

Sector Técnico

5

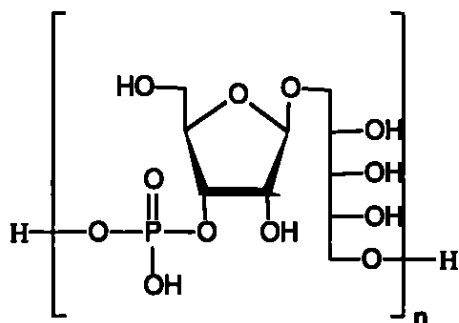
La presente invención se relaciona con el campo de la Medicina, en particular con la síntesis química de mezclas de oligosacáridos derivados de ribosa-ribitol-fosfato, las cuales son empleadas como principio activo en vacunas para la prevención de infecciones causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), así como con las vacunas que contienen dichas mezclas de oligosacáridos.

Técnica anterior

El *Haemophilus influenzae* tipo b constituye un serio problema de salud en el mundo. La bacteria[?] provoca, fundamentalmente en niños menores de 5 años, meningitis, neumonía, epiglotitis, y otras enfermedades del tracto respiratorio. Las secuelas observadas, que van desde sordera hasta retraso mental severo, sobrepasan en muchos países el 30 % de los casos que sobreviven a la enfermedad. Estimados recientes de la Organización Mundial de la Salud indican que en el mundo mueren hoy por enfermedades provocadas por el *Haemophilus influenzae* tipo b más de 550 000 niños anualmente.

El polisacárido purificado de *Haemophilus influenzae*, es capaz de provocar inmunidad protectora en adultos. Sin embargo, la inmunidad lograda en niños pequeños es muy pobre y es prácticamente nula en menores de 2 años.

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 cols. (Infection Immunity, 1983, 40, 245-256) prepararon el conjugado del polisacárido nativo con toxoide tetánico, después de activarlo con bromuro de cianógeno.

Gordon (Patente US No 4,496,538) activaron el polisacárido natural con bromuro de cianógeno y luego lo conjugaron a toxoide diftérico a través de la hidracida del ácido adípico.

Hilman y cols. (Patente US No 4,459,286) luego de activar el polisacárido capsular lo conjugaron 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 práctica 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.

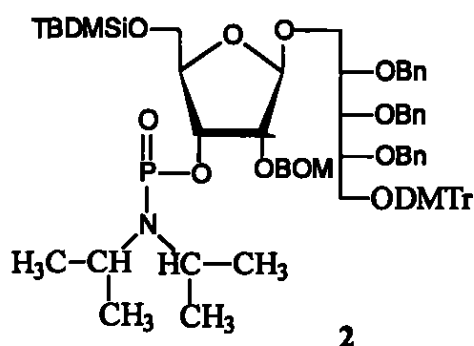
Es criterio de la Organización Mundial de la Salud, OMS, (M. R. Holliday, C. Jones, *Biologicals*, 1999, 27, 51-53), que para lograr una calidad estable, el control de las vacunas conjugadas debe basarse en métodos físico-químicos que permitan demostrar la reproducibilidad del producto de un lote a otro.

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 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 cols. (Solicitud de patente Europea EP 0276 516; Patente US 5,034,519; *Tetrahedron Lett.* 28, 1553, 1987) y Hoogerhout y cols. (*J. Carbohydr. Chem.*, 7, 1988, 399-416) obtuvieron por síntesis un fragmento del polisacárido capsular que reivindican, el cual 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 cols., *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 inmunogénico en ratones como las vacunas comerciales obtenidas por conjugación del polisacárido capsular.

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

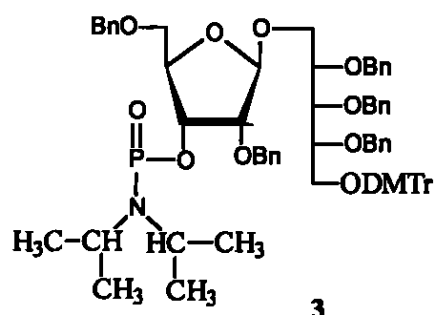


10 El rendimiento global es de 7 % (Hermans y cols., Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 1987, 106, 498-504). Además, este proceso tiene dos serios inconvenientes: se emplean 11 pasos cromatográficos y los grupos protectores del intermediario central no son los idóneos para el proceso de oligomerización.

En la oligomerización, o segunda etapa de síntesis, se empleó el método
15 en solución con activación a partir del fosfotriester, que permite rendimientos de 70-90% por ciclo basándose en el disacárido. 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
20 desprotección del producto al final de la síntesis y por lo tanto no es el más 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 cols. Infect. Immunity 1991, 59, 3504-10), sólo se reporta la conjugación de un trómero a toxoide tetánico y su inmunogenicidad en ratones y monos.

G. Just, J. Upešlaciš (Solicitud de patente Europea EP 0 320 942; L. Chan; G. Just, Tetrahedron, 46, 1990, 151-162) sintetizaron 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 y 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 basándose en el disacárido que oscilan entre un 70-90% por ciclo.

Kandil y cols. (Syn. Lett., 1992, 555-7), Chon y cols. (Solicitud de patente PCT WO 93/15205 y patente US 5,679,352) sintetizaron un fragmento del polisacárido capsular empleando el mismo disacárido intermediario **3** y por

síntesis en fase sólida usando como soporte monometoxipolietilenglicol lograron obtener fragmentos de hasta 6 unidades repetitivas del antígeno. La incorporación reportada por ciclo fue de 95%.

Krivan, y cols. (Solicitud de patente PCT WO94/00149) y Nilsson, y cols. (J. Carbohydr. Chem. 10, 1991, 1-22) lograron 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 cols. (J. Carbohydr. Chem., 13 1994, 465-474) y el Certificado de Autor CU 22424 reportaron 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 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.

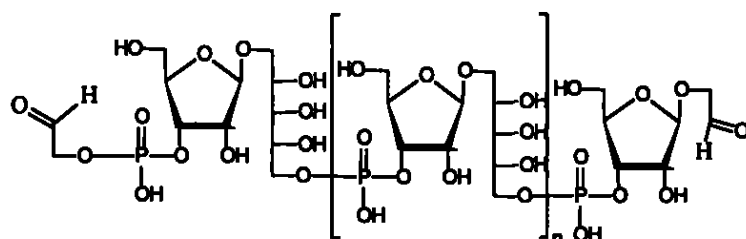
El proceso de oligomerización del disacárido intermediario puede realizarse en solución, con el serio inconveniente que el tamaño del antígeno que se puede alcanzar está limitado a 3-4 unidades repetitivas o también puede realizarse por fase sólida. La fase sólida permite alcanzar oligosacáridos de una
5 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 sólo 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
10 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 sólo fragmento oligosacarídico puro, que no contenga diferencias no sólo
15 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.

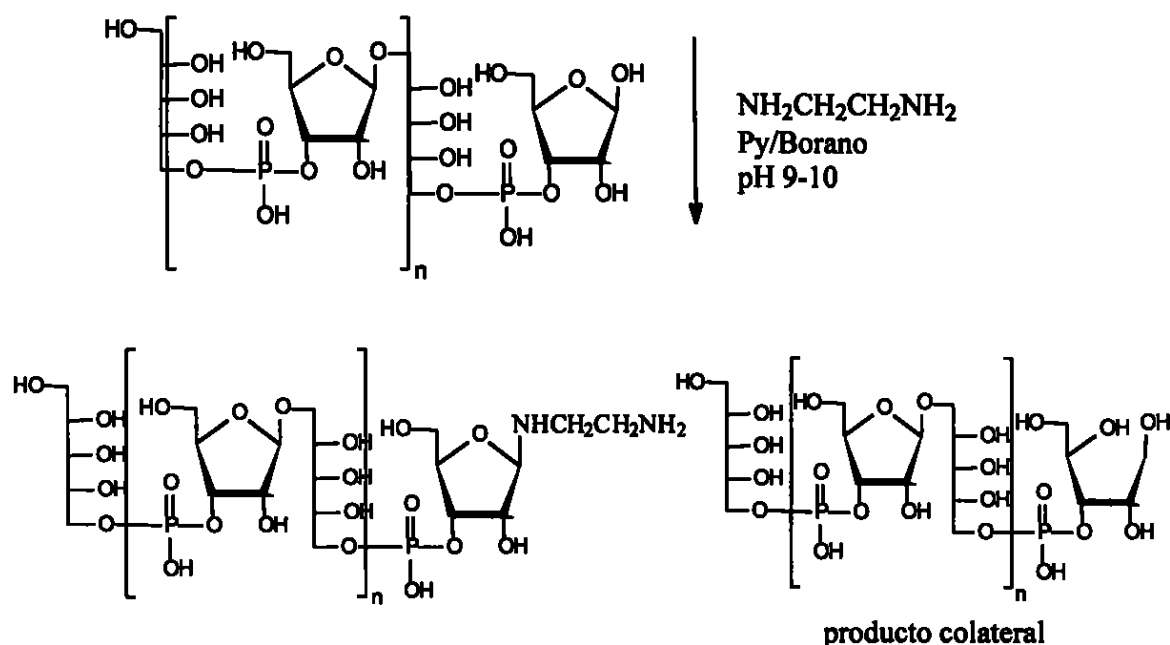
Con esta misma finalidad de mejorar y hacer más estable la calidad de
20 las vacunas conjugadas, a los trabajos iniciales con los polisacáridos naturales, sucedieron otros donde se han obtenido fragmentos oligosacarídicos por fragmentación de polisacáridos naturales y se han descubierto métodos que activan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

En las patentes norteamericanas US 4,808,700 y US 4,761,283, así como
25 en Glycoconjugate J., 1989, 6, 489-98 (R. C. Seid, y col), se describe la oxidación del polisacárido natural con peryodato y la purificación de los fragmentos obtenidos. Los mezcla 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.



Por otra parte, en la patente norteamericana US 5,153, 312, así como en Vaccine 1999, 17, 1251-63 (P. Constantino y cols.) se reporta la hidrólisis del polisacárido natural con ácido acético y la purificación de la mezcla de fragmentos oligosacarídicos 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 sólo 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 práctica 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 más 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 vacunas conjugadas 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 del estado del arte, que hacen posible determinar fácilmente la composición de una mezcla de fragmentos de oligosacáridos de Hib (P. Constantino, y cols., Vaccine 1999, 17, 1251-1263 y D. Prieti, 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 cols., *Infection and Immunity*, 1991, 59, 4371-6; A. A Kandil, y cols., *Glycoconjugate J.*, 1997, 14, 13-17 y Peters CCAM, y cols., *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 está 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 son en principio más estables, ya que tienen como ventaja que aunque se degraden a la mitad de su talla, el fragmento unido a la proteína carrier mantendrá más 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 al estado del arte 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 hecho, 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 niños, la cual 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 número de etapas de síntesis del disacárido clave, reducir el número de pasos cromatográficos y sobretodo incrementar de manera sensible los rendimientos del proceso de oligomerización.

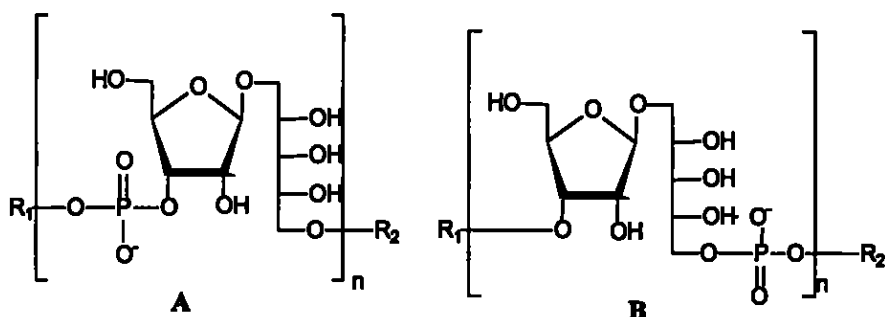
Las mezclas de oligosacáridos obtenidas por hidrólisis del polisacárido natural al contener fracciones de ambos intervalos de tallas, reúnen las ventajas de cada uno y por otra parte amortiguan el efecto de sus desventajas. Si mezclas semejantes pudieran ser obtenidas por síntesis, estas tendrían las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

Divulgación de la Invención

La presente invención se relaciona particularmente con la síntesis química de mezclas de oligosacáridos derivados de ribosa-ribitol-fosfato, las cuales son empleadas como principio activo en vacunas para la prevención de infecciones causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), así como con las vacunas que contienen dichas mezclas de oligosacáridos.

Las mezclas de oligosacáridos obtenidas por síntesis química de la presente invención comprenden unidades repetitivas de fórmula (fosfato-ribosa-ribitol) n o (ribosa-ribitol-fosfato) n de al menos 5 compuestos de estructura A ó B, las cuales representan la unidad repetitiva del polisacárido capsular del *Haemophilus influenzae* tipo b y difieren sólo por n , siendo n un valor comprendido entre 4 y 25 ($n=4$ y $= 25$), y donde R_1 ó R_2 es un espaciador para

la conjugación a un carrier, con la condición que R_1 = espaciador si R_2 = H, ó R_2 = espaciador si R_1 = H:



La invención también se relaciona con los inmunógenos que contienen estas mezclas oligosacarídicas, con las vacunas que contienen esos inmunógenos y con los métodos para preparar estos oligosacáridos en forma de mezclas. Además, la invención contempla el uso de las vacunas, ya sean solas o en combinación con otras vacunas, para la prevención de las infecciones causadas por el *Haemophilus influenzae* tipo b.

Mediante la invención pueden obtenerse por síntesis química una mezcla regular de oligosacáridos de talla definida y de forma eficiente. Esta mezcla tiene una pureza superior y se obtiene mediante un procedimiento técnico más sencillo. 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.

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.

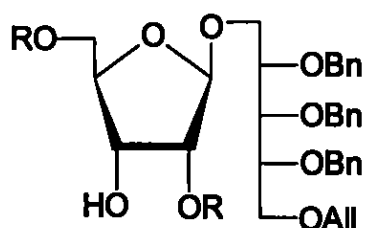
Constituye también un objeto de la presente invención el uso de las mezclas de oligosacáridos antes mencionados en la elaboración de

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 adyuvantes u otros aditivos.

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

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 sólo 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 inmunológicamente inertes como la poliacrilamida, poliestireno, látex, etc., lo que permite cuantificar los
5 mencionados anticuerpos.

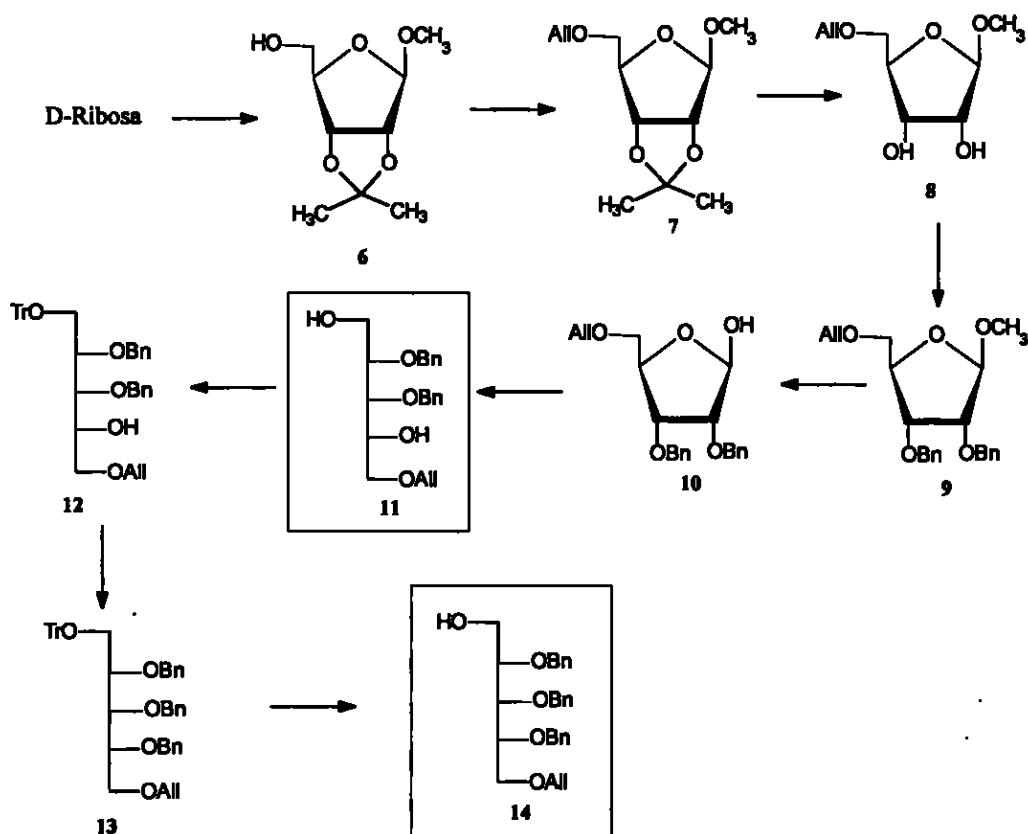
La novedad de la presente invención consiste en la propia composición de la mezcla de oligosacáridos obtenidos, que responden a la unidad repetitiva del polisacárido capsular del *Haemophilus influenzae* tipo b con un espaciador para su conjugación en uno sólo de sus dos extremos, en una posición prediseñada
10 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 fundamentalmente entre 4-6 y 8-20, reúne las ventajas de los compuestos individuales y disminuye las desventajas que cada uno de ellos pudiera tener por separado.

Además, la novedad de la presente invención está en el propio proceso de elaboración de estas mezclas a través de síntesis, lo que permite obtener el producto con alta reproducibilidad y eficiencia. Asimismo, mediante la presente invención se demuestra que una sola reacción permite introducir los grupos protectores bencilo en la unidad de ribosa en una sola etapa, incrementándose
20 así 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
25 transforma en el derivado isopropiliden **6** siguiendo el procedimiento descrito previamente en el arte (Leonart y cols., 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**, el cual es sometido a una reacción de bencilación con cloruro de bencilo e hidruro de sodio en dimetilformamida.

5



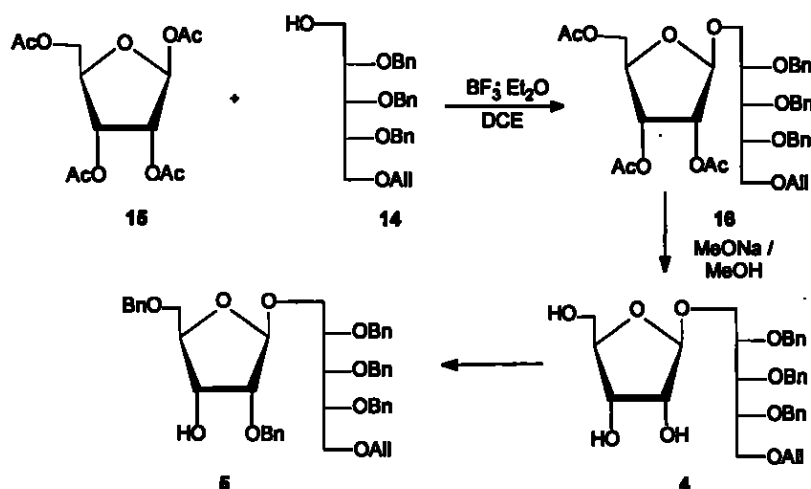
El grupo metilo es hidrolizado con una mezcla de ácido acético y ácido clorhídrico seguido de una reducción con borohidruro de sodio. El derivado 5-O-alil-2,3-di-O-bencil-D-Ribitol **11** se absorbe en silicagel y se extrae selectivamente gracias a un proceso de percolación primero con ciclohexano y 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

15

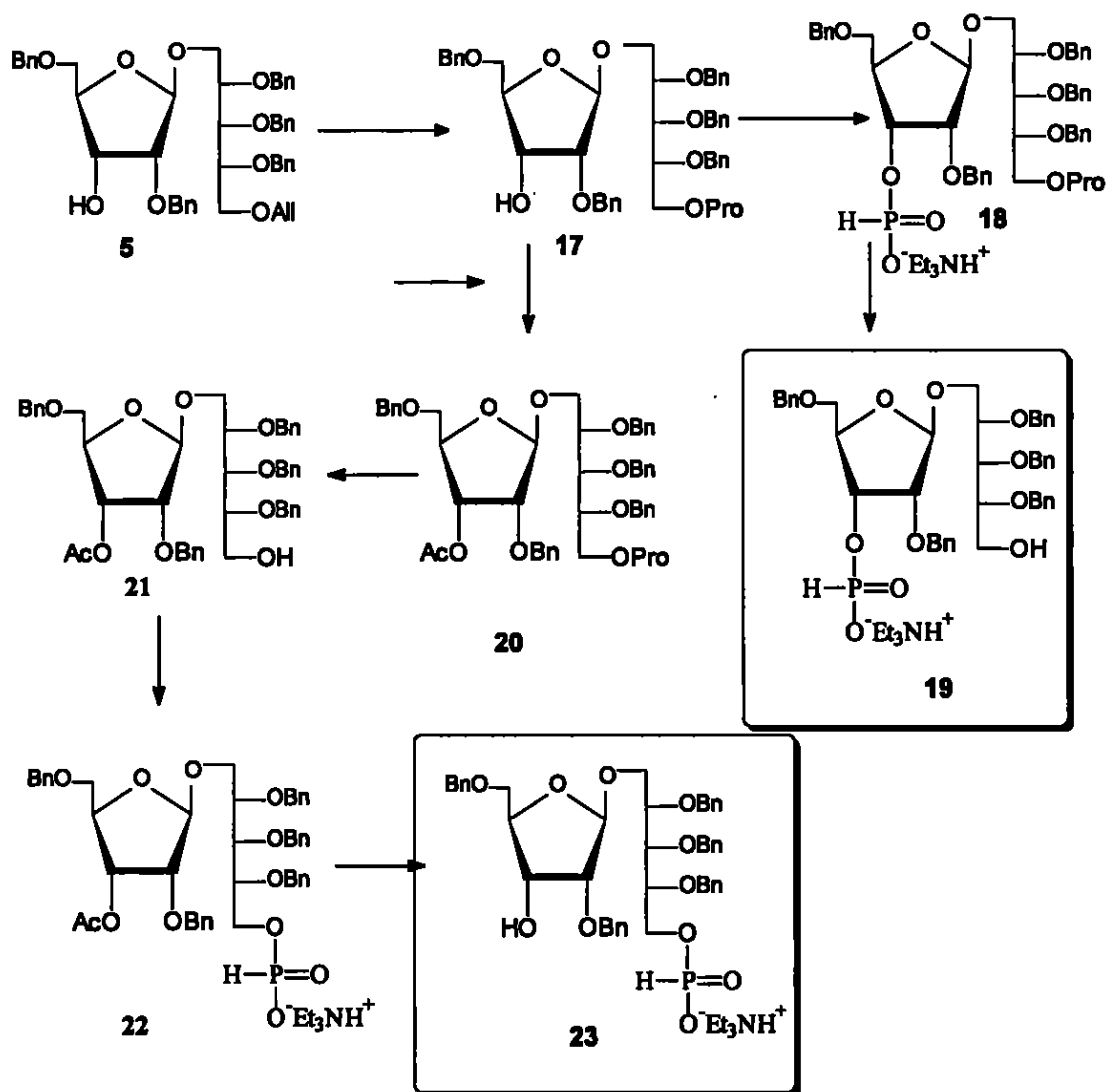
del ribitol **14** es ribosilado como se muestra en el siguiente esquema con el derivado de la ribosa peracetilado **15**. La desacetilación, seguida de una nueva aplicación de la técnica de absorción-desorción, permite llegar al triol **4** en gran escala, sin recurrir a etapas cromatográficas.

5

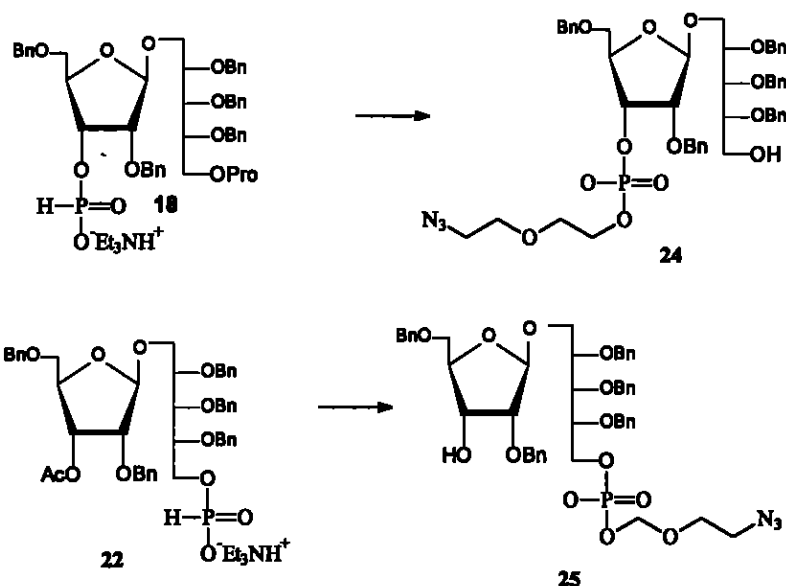


A continuación se aplica sobre este triol **4** la reacción de dibencilación encontrada en el marco de la presente invención, y que permite obtener el derivado **5**, luego de un proceso de purificación por cromatografía de columna.

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.



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.



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

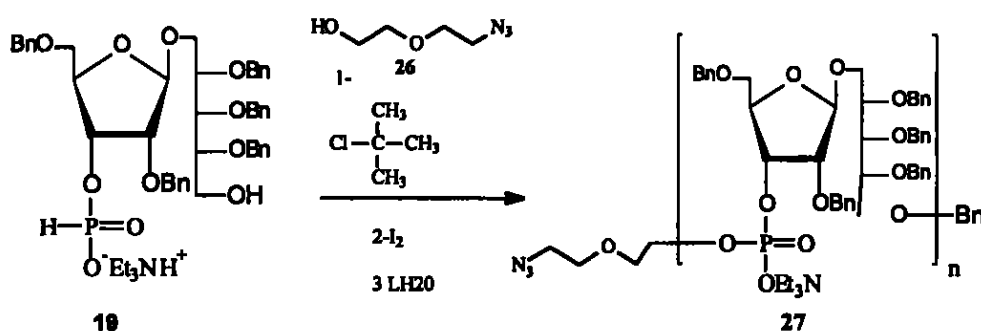
5 La reacción de oligomerización se estudió bajo diferentes condiciones, siempre sobre la base del uso de sólo tres componentes, un disacárido clave (**19** o su análogo **23**), un promotor de la reacción, que puede ser cloruro de pivaloilo, cloruro de adamantano-1-carbonilo u otro cloruro de ácido impedido estéricamente, y un tercer componente que es el encargado de detener la

10 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** ó **26**.

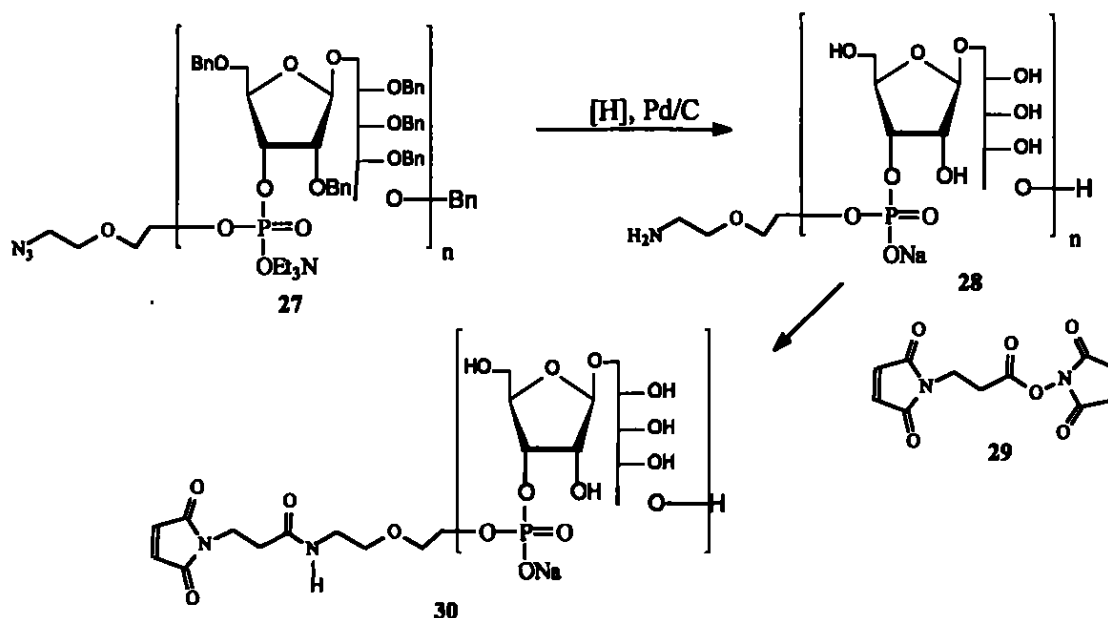
En calidad de espaciador que para las sustancias **24**, **25** ó **26** es el 5-azido-3-oxapentanol, se pueden emplear además cualquiera de los compuestos

15 de formula global R_1-Y-OH , donde Y es una cadena espaciadora que puede estar formada por una cadena carbonada alifática que puede tener intercalada una cadena aromática o por un número de heteroátomos que pueden oscilar entre 0-5. El grupo funcional R_1 en el extremo del espaciador 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 disacárido **19**, el espaciador 5-azido-3-oxapentanol **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 oligómeros **27** con un rendimiento de 70-85% sobre la base del disacárido.

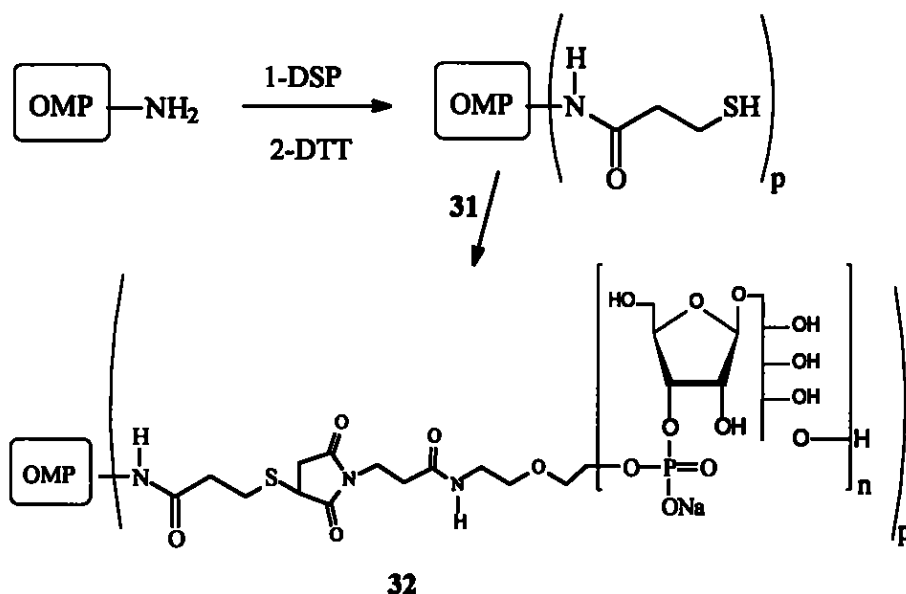


La mezcla de oligosacáridos **27** es hidrogenada en metanol-acetato de etilo-ácido acético-agua en presencia de paladio sobre carbono para dar la mezcla cruda de oligosacáridos **28**. Si el grupo del espaciador debe ser activado, el proceso se realiza en la etapa siguiente. Por ejemplo a la mezcla 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
 5 por resonancia magnética nuclear ¹H, ¹³C y ³¹P y por experimentos de
 correlación H-H y H-X.

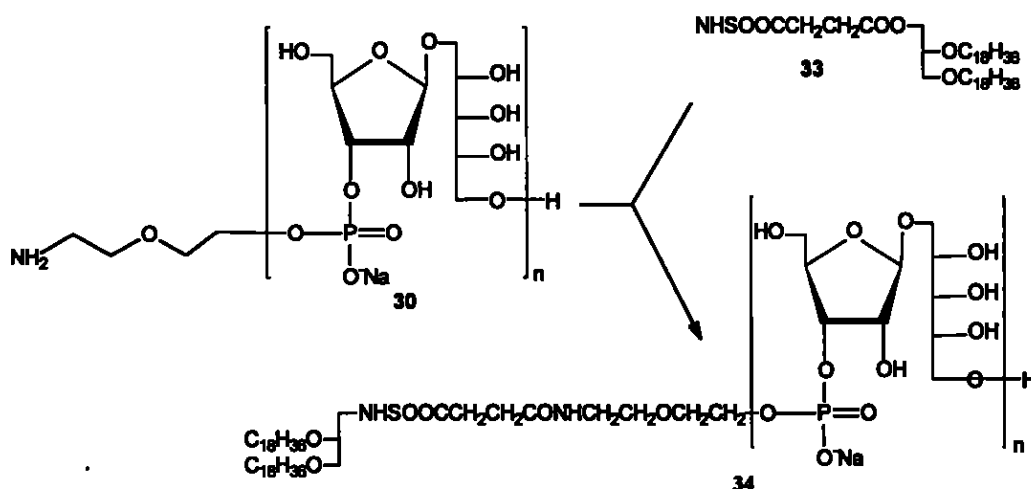
Las proteínas por su parte son funcionalizadas con ácido tiopropiónico,
 para lo cual el tiol se introduce enmascarado en forma de enlace bisulfuro a
 través de reactivos como el SPDP o el DSP, seguido de una reacción con
 10 ditiotreitól en atmósfera inerte. La separación del exceso de reactivo se puede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



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

Alternativamente, el exceso de los reactivos activantes se puede 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.

La mezcla de oligosacáridos **30** se puede conjugar a otros tipos de carrier, por ejemplo lípidos. Así, por ejemplo, la reacción con el 2,3-di-octadeciloxipropil succinimidil butanedioato **33** en presencia de carbodiimida permite obtener el conjugado **34**



El conjugado de la mezcla de oligosacáridos sintéticos y las proteínas puede ser diluido en un buffer fisiológico adecuado y puede además ser mezclado con aditivos como adyuvantes, preservantes u otros, con la finalidad de obtener la formulación definitiva de la vacuna.

5 Asimismo, la vacuna puede ser mezclada antes o durante el proceso de formulación con otras vacunas de las empleadas en los esquemas de inmunización del niño menor de un año. Por ejemplo se puede mezclar con las proteínas la membrana externa de *Neisseria meningitidis* tipo B (OMP) y conformar una vacuna combinada anti-Hib y anti-meningococo B. Puede
10 mezclarse con la vacuna DTP y formar una vacuna combinada tetravalente anti-Hib y anti-difteria, pertusis y tétanos.

La inmunogenicidad de la vacuna conjugada entre la mezcla de oligosacáridos 30 y las proteínas de la membrana externa del meningococo fue demostrada en diferentes modelos animales. La presencia de anticuerpos
15 contra el polisacárido capsular de Hib inducidos por la preparación vacunal se detectó mediante el método de ELISA (D. C. Phipps y cols., J. Immunolog. Methods, 1990. 135. 121-8). Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 2-5.

En conejos, la vacuna formulada sin alúmina induce una respuesta
20 superior en la primera dosis. Sin embargo ambas preparaciones se equiparan luego de la segunda dosis y provocan un alto título de anticuerpos.

En el ejemplo de ratas Sprague-Dawley, la vacuna preparada a partir de dos conjugados que difieren en la relación oligosacárido-proteína mostraron también altos títulos de anticuerpos anti-Hib.

25 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 estudió 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.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN:

EJEMPLO 1: Síntesis del 5-O-allyl-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 2.6g 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 al menos 2 horas.

Bencilación.- Posteriormente el producto obtenido se disuelve en 450 mL de dimetilformamida. La solución resultante se enfría a 0°C y se añaden lentamente sobre la misma 50g 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 horas 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.

- 5 *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
10 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 y 400 mL de agua, y finalmente se seca con sulfato de sodio y se rotoevapora.

Reducción.- El sirope resultante se disuelve en etanol (800 mL) se enfría el sistema hasta 20°C y se añaden 24g NaBH₄. La mezcla reaccionante se agita a
15 temperatura ambiente por espacio de 1.5 hours 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.

20 **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
25 silicagel se coloca en un equipo de percolación. Las impurezas presentes se
extraen con ciclohexano por espacio de 48 horas. Posteriormente se cambia el
solvente a diclorometano y el producto se extrae en forma de sirope amarillo

claro cromatográficamente puro. Rendimiento 75-95%. RMN ^{13}C δ 60.7(C-1), 70.2 (C-4), 71.0, 71.7, 72.0, 73.6 (PhCH₂C- 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.

5 *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 y 0.5g de dimetilaminopiridina y la mezcla se agita a 50°C por espacio de 6 horas. Una vez concluida la reacción se rotoevapora y el residuo se disuelve en 500 mL de diclorometano, se lava con 1
10 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 25g de hidruro de sodio y una vez terminada la adición se mantiene la agitación por
15 espacio de 30 minutos. Se gotea entonces 40 mL de cloruro de bencilo y la reacción se mantiene agitando por espacio de 1 hora. 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
20 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
25 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 ^{13}C δ 61.2 (C-1),

69.6, 71.8, 72.1, 72.3. 73.9 (PhCH₂C -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.

5 *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 (207g) 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** (370g)
10 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
15 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
20 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
25 hasta pH 6-7. La resina se separa por filtración a vacío. El sirope obtenido (427g) 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.

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 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 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'), ¹³C 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 (200g) en tolueno (2 L), se añade Bu₂SnO (80g) y se refluxa durante 4 horas. Se enfría a temperatura ambiente y se añade poco a poco NaH al 50 % (56g). Se agita a 80°C alrededor de media hora y se añade yoduro de tetrabutil amonio (62g). 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, $-\text{CH}=\text{}$), 5.18 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{}$), 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'-

5 O-trietilamonio fosfonato- ribofuranosil)-D-ribitol (19).

Isomerización del grupo alilo.- 20g del sirope resultante del ejemplo anterior, se secan a alto vacío por espacio de 2 horas. Se añaden al mismo dimetilsulfóxido seco (100 mL) y t-butoxido de potasio (6.4g). La reacción se coloca a 100°C por espacio de una hora, y luego se vierte sobre 250 mL de agua helada. Se
10 adiciona ácido clorhídrico concentrado 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)
15 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
20 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
25 redisuelve 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).

5 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 minutos. Se adiciona entonces el espaciador **26** (14.6mg) y una nueva cantidad de cloruro de trimetilacetilo (0.9 mL) y la reacción se agita por un nuevo intervalo de 1 hora. Se adiciona una solución de I_2 (1.1g) en piridina-
10 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
15 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
20 mL) y la reacción se agita por un intervalo de 2 horas. Se adiciona una solución de I_2 (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).

25 A una solución del compuesto **19** (1g) y el espaciador **24** (29.2mg) 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 horas. Se adiciona una solución

de I₂ (1.1g) 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).

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

10 **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 horas. Se adiciona una solución de I₂ (1.1 g) en
15 piridina-agua (7.3 mL; 20-1) y el producto se trata de manera similar al ejemplo 8.

EJEMPLO 13: Reacción de hidrogenación de los productos de los Ejemplos 8-12

 El producto crudo de los ejemplos 8-12 es hidrogenado en una mezcla de
20 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
25 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 (CH_2NH_2). ^{31}P δ 2.14 (espac-P-Rib) 0.74 (Ribitol-P-Rib).

EJEMPLO 14: Síntesis del derivado 5-(3-maleimidopropionamido)-3-xapentil oligo ribosil ribitol fosfato 30.

5 A una solución del producto del ejemplo anterior (3.34 mg, 1.73 μmol) en agua bidestilada (0.1 mL), se le adicionó 0.7 mg (2.62 μmol) de N-hidroxisuccinimidil β -maleimidopropionato **27** disuelto en N,N-dimetilformamida (0.4 mL). Después de 4 horas de reacción, la solución se evaporó a vacío y se resuspendió en agua destilada (0.5 mL), se centrifugó (10
10 minutos, 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, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.01 (s, H-1) 3.41 (t, 2H, CH_2NH), 2.56 (t, 2H, CH_2a).

15 **EJEMPLO 15: Análisis de los productos obtenidos en el Ejemplo 13 por cromatografía de intercambio iónico.**

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.s., Vaccine 1999, 17, 1251-1263). El perfil cromatográfico de elución
20 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 más de 20.

25 **EJEMPLO 16: Conjugación con las proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*.**

Se disuelve la masa de proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* o meningococo (OMPC) de un frasco que contiene aproximadamente 400 mg de proteína en 80 mL del PBS burbujeado con N₂ (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 adicionan 1.6 mL de la solución de DSP en DMP y se agita lentamente a 4°C por 2 horas. Se adiciona 1.6 mL de solución de DTT en PBS- y se agita lentamente a 4°C el frasco bien tapado por 1 hora. Se trasvasa la solución sobre un frasco con 20-400 mL de etanol frío y se centrifuga a 1800 rpm y 4°C por 30 minutos. Se decanta el sobrenadante y el sólido 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 horas. 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 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 horas. Se adiciona 1.6 mL de solución de DTT en PBS y se agita lentamente a 4°C el frasco bien tapado por 1 hora. Se trasvasa la solución a un equipo de ultrafiltración con membrana de 10000, se ultrafiltra adicionando buffer fresco, previamente burbujeado con N₂(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 horas. 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 6 horas. Se añade una nueva porción de carbodiimida y la reacción se continúa con agitación por espacio de 6 horas. 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 minutos. 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.

EJEMPLO 20: Preparación de la vacuna con alúmina 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 alúmina 1-0.01mg por mL en agua bidestilada. Se agita durante 20 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 con adyuvante de alúmina.

EJEMPLO 21: Preparación de una vacuna combinada anti-Hib y antimeningocócica 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 del complejo de proteínas de la membrana externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis* tipo B, de la empleadas en la producción de la vacuna VA MENGOC BC, a una concentración en PBS de 100-200 mg por mL. Luego de 20 minutos de homogeneización por agitación magnética suave, el contenido de la reacción se mezcla con igual volumen de solución de alúmina 1-0.01mg por mL en agua bidestilada. Se agita durante 20 minutos a 4-6°C. Se determina la concentración del antígeno de Hib por estimación de ribosa y de las proteínas mediante el método de 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 antimeningocócica B adyuvada en alúmina.

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 mL, 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 minutos de homogeneización por agitación magnética suave, el contenido de la reacción se mezcla con igual volumen de solución de alúmina 1-0.01mg por mL en agua bidestilada. Se agita durante 20 minutos a 4-6°C. Se determina la concentración del antígeno de Hib por estimación de ribosa y de las proteínas totales mediante 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.

EJEMPLO 23: Ensayos inmunológicos de la vacuna obtenida a partir del oligómero y la OMP.

La vacuna de los ejemplos 19 y 20 se utilizó para inmunizar a una dosis de 1µg o 2µg de antígeno. Los animales usados para este ensayo 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 análisis.

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 alcanzados se muestran en las Figuras 2-5.

EJEMPLO 24: Conjugado de la mezcla de ligosacáridos 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 horas. Se adiciona a la misma 0.1-0.5 mL de amoniaco y la agitación se continúa por espacio de 24 horas. 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 obtenidos en este ensayo se muestran en la Figura 6.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1. Cromatograma típico de las fracciones de oligómeros obtenidas en el Ejemplo 15 por cromatografía de intercambio iónico en Mono Q HR 5/5 con un gradiente lineal de NaCl de 0-500 mM, donde A: pentámero; B: Oligómero del Ejemplo 10.

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

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

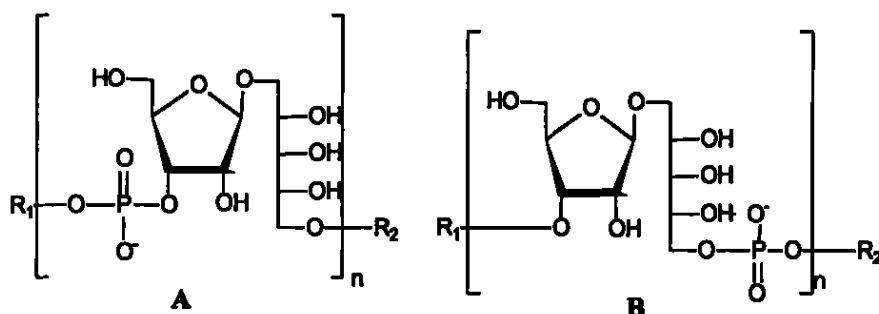
Figura 4. Respuesta de anticuerpos de ratas inmunizadas con la vacuna del Ejemplo 15.

Figura 5. Respuesta de anticuerpos de ratones Balb C inmunizados con la vacuna del Ejemplo 15.

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

REIVINDICACIONES

1. Mezclas de oligosacáridos que comprenden unidades repetitivas de fórmula (fosfato-ribosa-ribitol) $_n$ o (ribosa-ribitol-fosfato) $_n$ caracterizadas porque dichas mezclas son obtenidas mediante síntesis y comprenden al menos 5 compuestos de estructura A ó B siendo n un valor comprendido entre 4 y 25, y donde R_1 ó R_2 es un espaciador para la conjugación a un carrier, con la condición que R_1 = espaciador si R_2 = H, ó R_2 = espaciador si R_1 = H.



2. Mezclas de oligosacáridos de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizadas porque dichos compuestos de fórmula (fosfato-ribosa-ribitol) $_n$ o (ribosa-ribitol-fosfato) $_n$ de estructura A ó B difieren sólo por n , siendo n un valor comprendido entre 4 y 25.
3. Mezclas de oligosacáridos de acuerdo con la reivindicación 1 donde el espaciador es cualquier cadena hidrocarbonada alifática que contiene intercalado un número de heteroátomos entre 0-5 y/o una cadena aromática, el cual posee por el otro extremo un grupo funcional NH_2 , $COOR$, CHO , SH o uno de sus precursores, capaz de formar un enlace químico con una molécula con función de carrier.
4. Procedimiento para sintetizar una mezcla de oligosacáridos que comprende unidades repetitivas de fórmula (fosfato-ribosa-ribitol) $_n$ o (ribosa-ribitol-fosfato) $_n$ caracterizado porque se efectúa una reacción de policondensación de una sola etapa aplicada al derivado disacárido 19 ó 23 en presencia de

un promotor en un solvente básico, y con un espaciador que interviene en la reacción como aceptor deteniendo el crecimiento de la cadena del oligómero.

5. Procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado porque el disacárido intermedio **19** ó **23** y el promotor se encuentran en una proporción molar de 1/1-3.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 4 y 5 caracterizado porque dicho promotor es un derivado activado de un ácido impedido estéricamente.
7. Procedimiento según las reivindicaciones de la 4 a la 6 caracterizado porque el promotor es preferentemente cloruro de pivaloilo, cloruro de adamantoilo o un derivado activado de un ácido fosfórico.
8. Procedimiento según la reivindicación 4 caracteriza porque el disacárido intermedio **19** ó **23** y el espaciador se encuentran en una proporción molar entre 5-10/1.
9. Procedimiento según las reivindicaciones de la 4 a la 8 caracterizado porque el disacárido es **19**, el espaciador es **24**, el promotor es cloruro de pivaloilo y el solvente básico es piridina.
10. Procedimiento para sintetizar la mezcla de oligosacáridos de las reivindicaciones de la 1 a la 3 caracterizado porque los compuestos obtenidos según el procedimiento de las reivindicaciones de la 4 a la 9 se someten posteriormente a 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 menores que 4 o mayores que 25 unidades repetitivas, por uno o varios procesos de tamizaje o corte molecular.
11. Inmunógeno que contiene las mezclas de oligosacáridos de las reivindicaciones de la 1 a la 3 caracterizado porque la mezcla oligosacáridica

está asociada a una molécula carrier seleccionada del grupo consistente en proteínas, péptidos o lípidos.

12. Vacuna que contiene el inmunógeno de la reivindicación 11 formulado con o sin adyuvante u otros aditivos, para la prevención de las enfermedades infecciosas provocadas por el *Haemophilus influenzae* tipo b.

13. Vacuna según la reivindicación 12 empleada en combinación con otras vacunas tales como 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 en combinación con sus respectivos inmunógenos.

14. Método para la síntesis del disacárido intermediario 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 ribofuranosa seguido de desacetilación para dar lugar al compuesto **4** que se somete a purificación por adsorción-desorción en silicagel.

15. Método para sintetizar el disacárido intermedio **17** que comprende un procedimiento de dibencilación del disacárido **4** con óxido 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. Disacárido 5-O-propenil-2,3,4-tri-O-bencil-1-O-(2',5'-di-O-bencil- β -D-ribofuranosil)-D-ribitol **17** obtenido como intermedio en la síntesis de los derivados **19** y **23**.

17. Derivados disacarídicos 2,3,4-tri-O-bencil-1-O-(2',5'-di-O-bencil- β -D-ribofuranosil)-D-ribitol-5-O-fosfonato de trietilamonio **23** y 2,3,4-tri-O-bencil-1-O-(2',5'-di-O-bencil- β -D-ribofuranosil)-D-ribitol-3'-O-fosfonato de

triethylamonio **19** obtenidos como intermedios claves en la reacción de oligomerización de las reivindicaciones de la 4 a la 9.

18. Método para preparar los disacáridos **19** ó **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.

19. Uso de los disacáridos **19** ó **23** para la síntesis de las mezclas de oligosacáridos de las reivindicaciones de la 1 a la 3.

10 20. Macromoléculas que contienen la mezcla de oligosacáridos de las reivindicaciones de la 1 a la 3, cuya mezcla oligosacaridica esta asociada a un material polimérico inmunológicamente inerte.

21. Uso de las macromoléculas de la reivindicación 20 para la detección y cuantificación de anticuerpos anti-polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b.

Figura 1

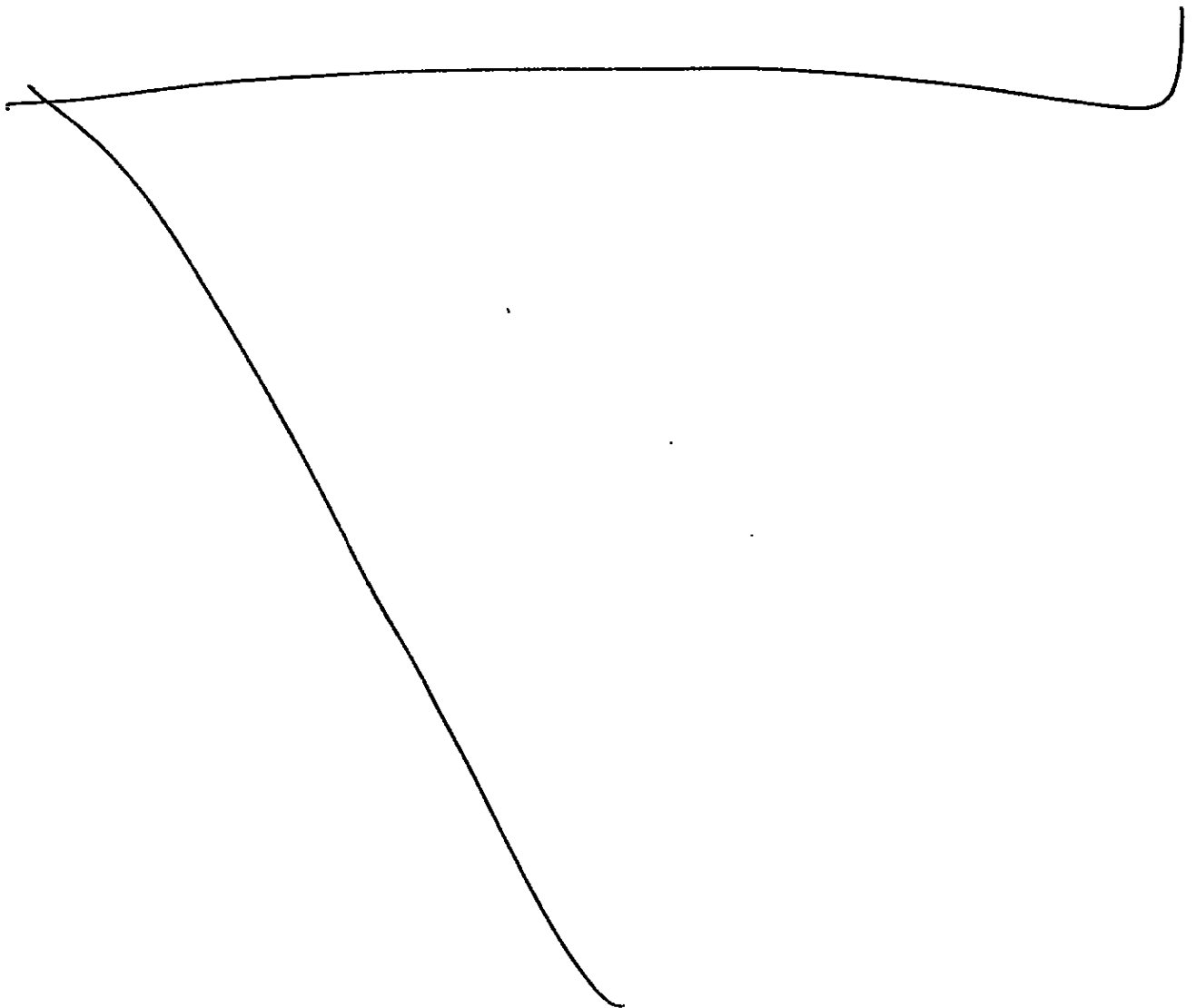
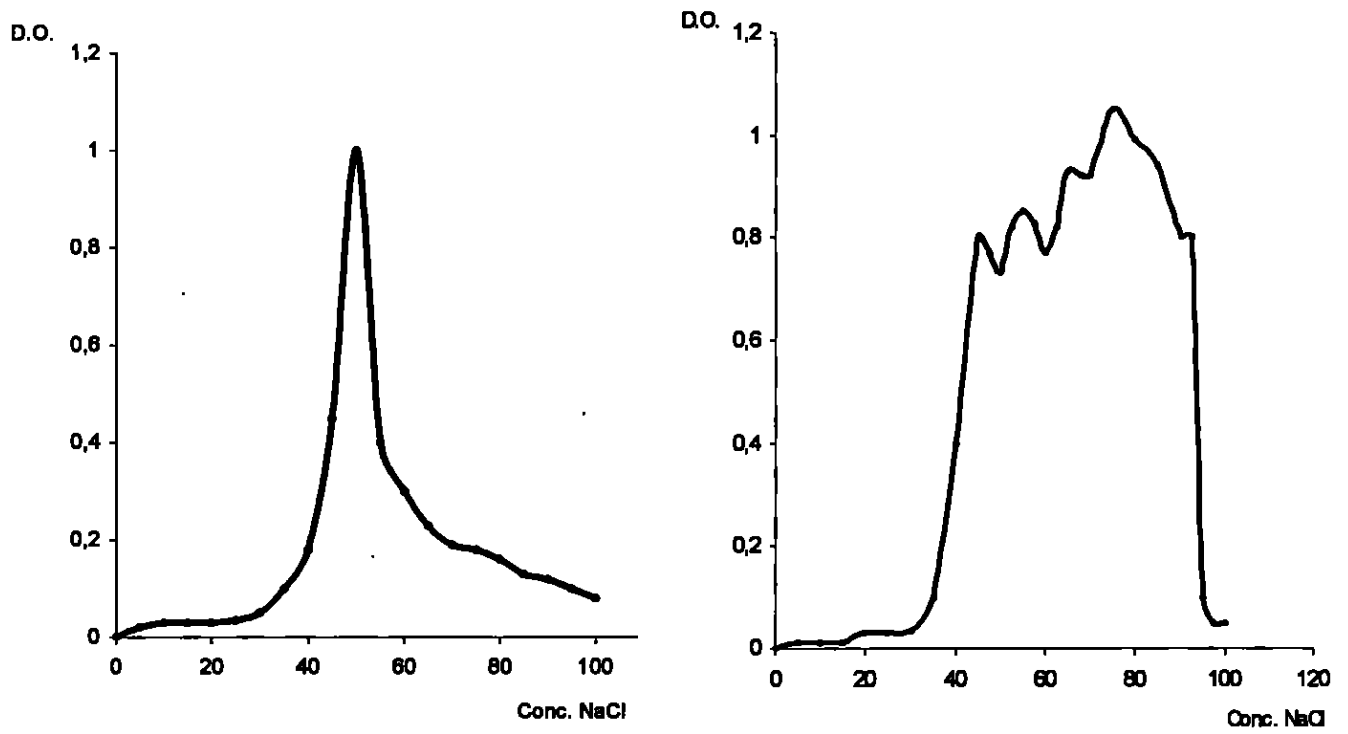


Figura 2

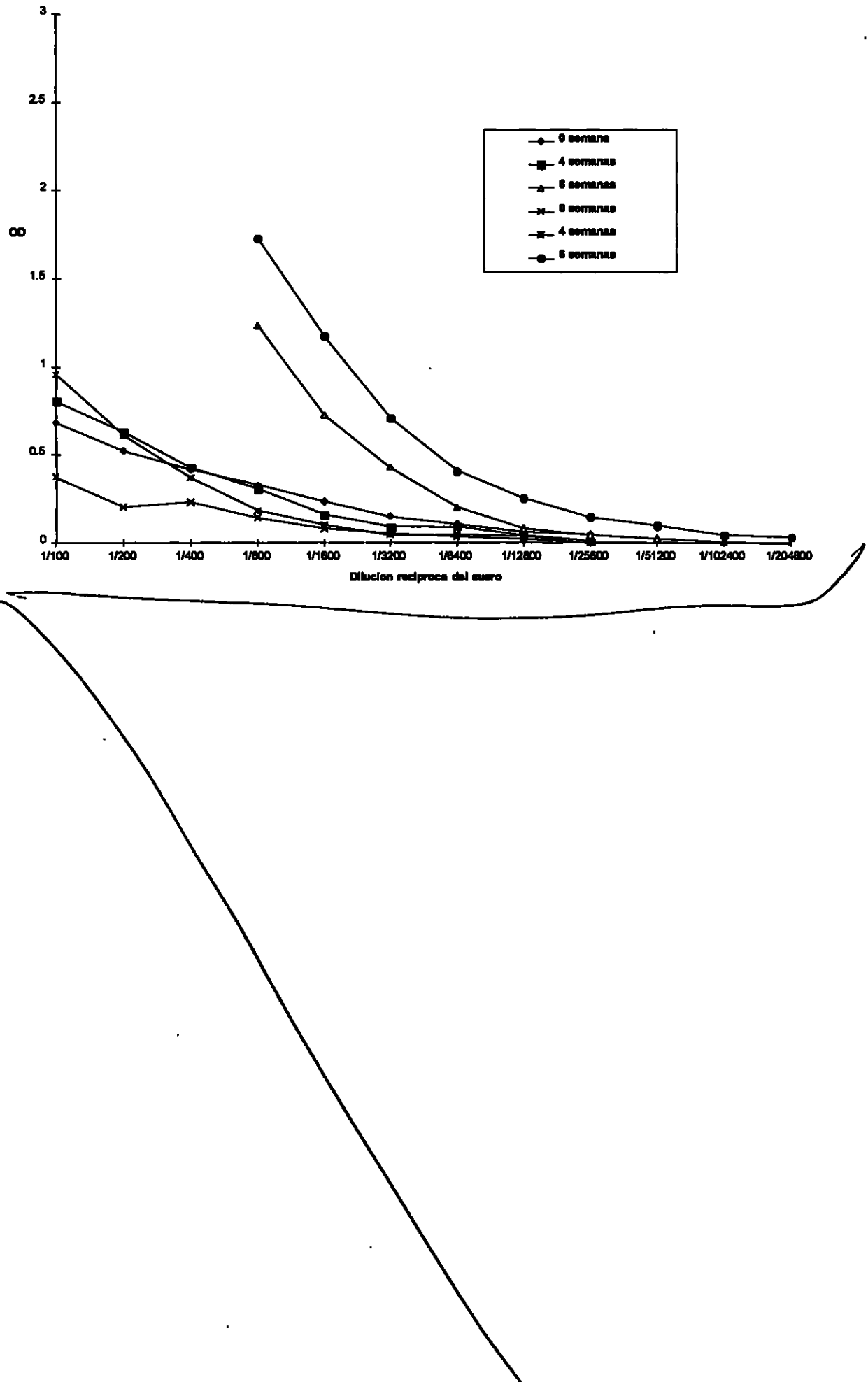


Figura 3

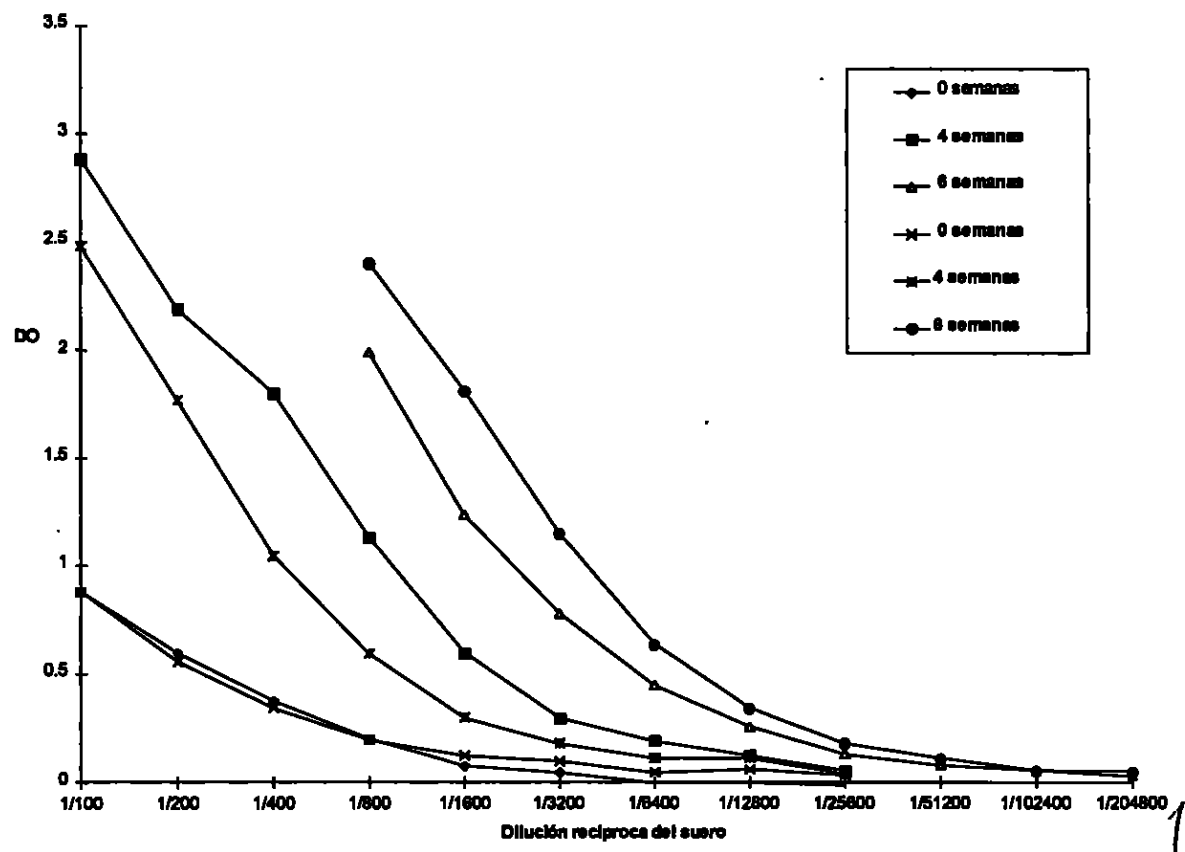


Figura 4

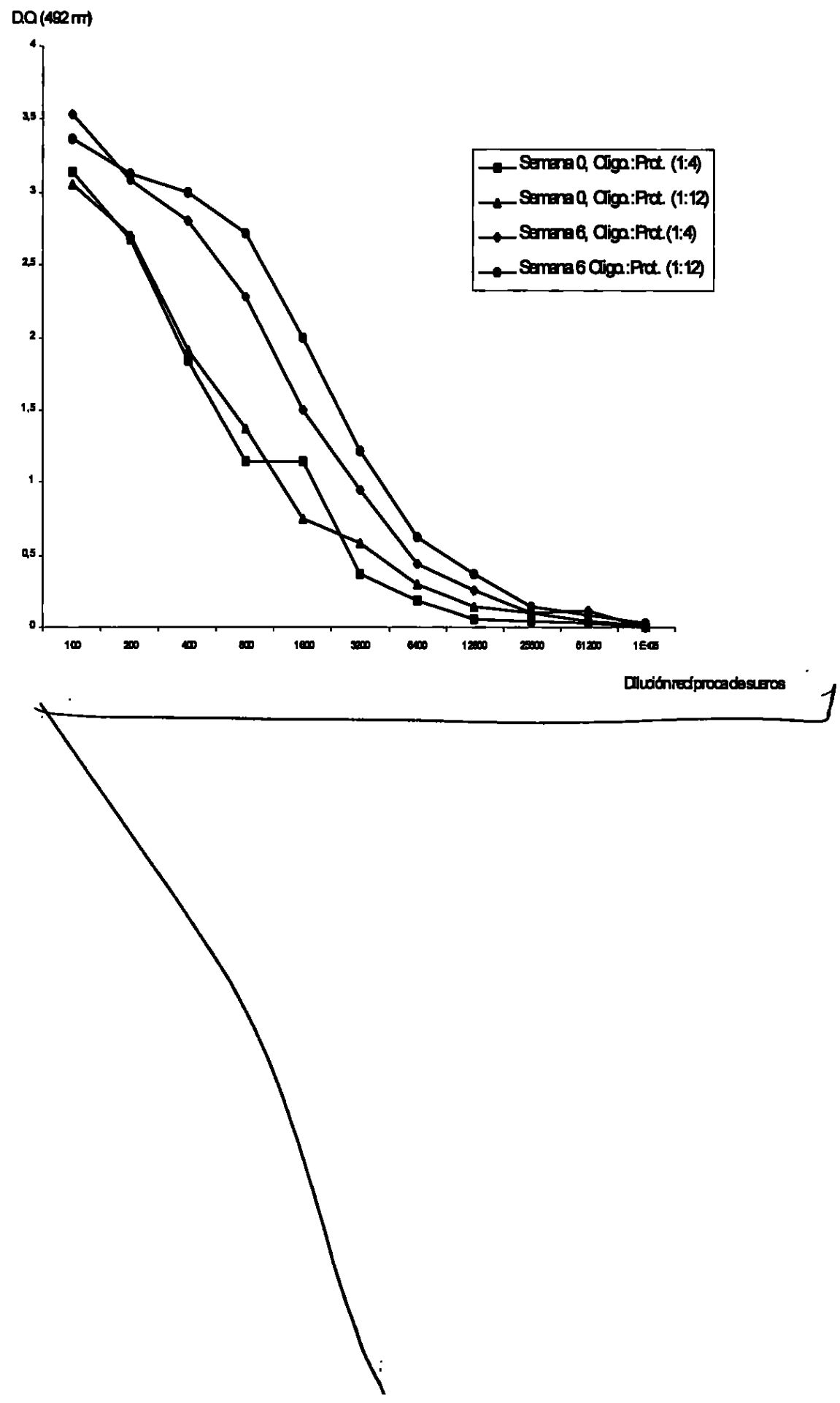


Figura 5

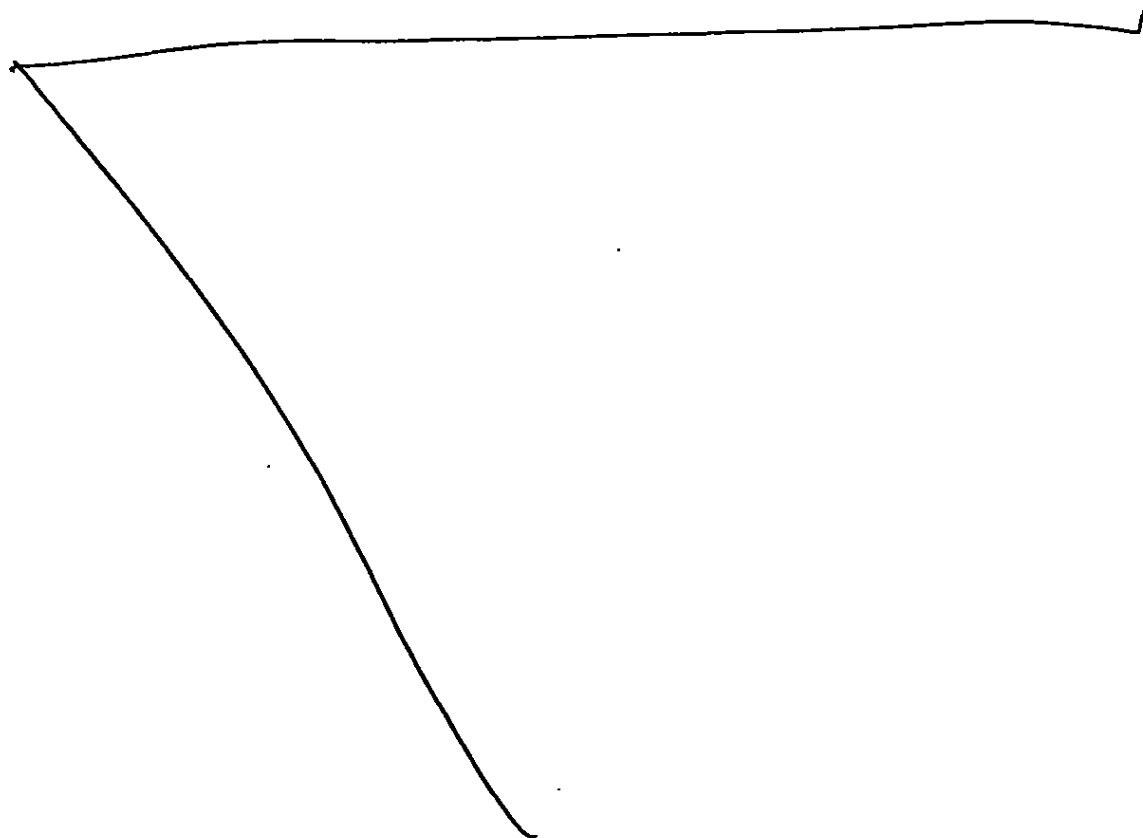
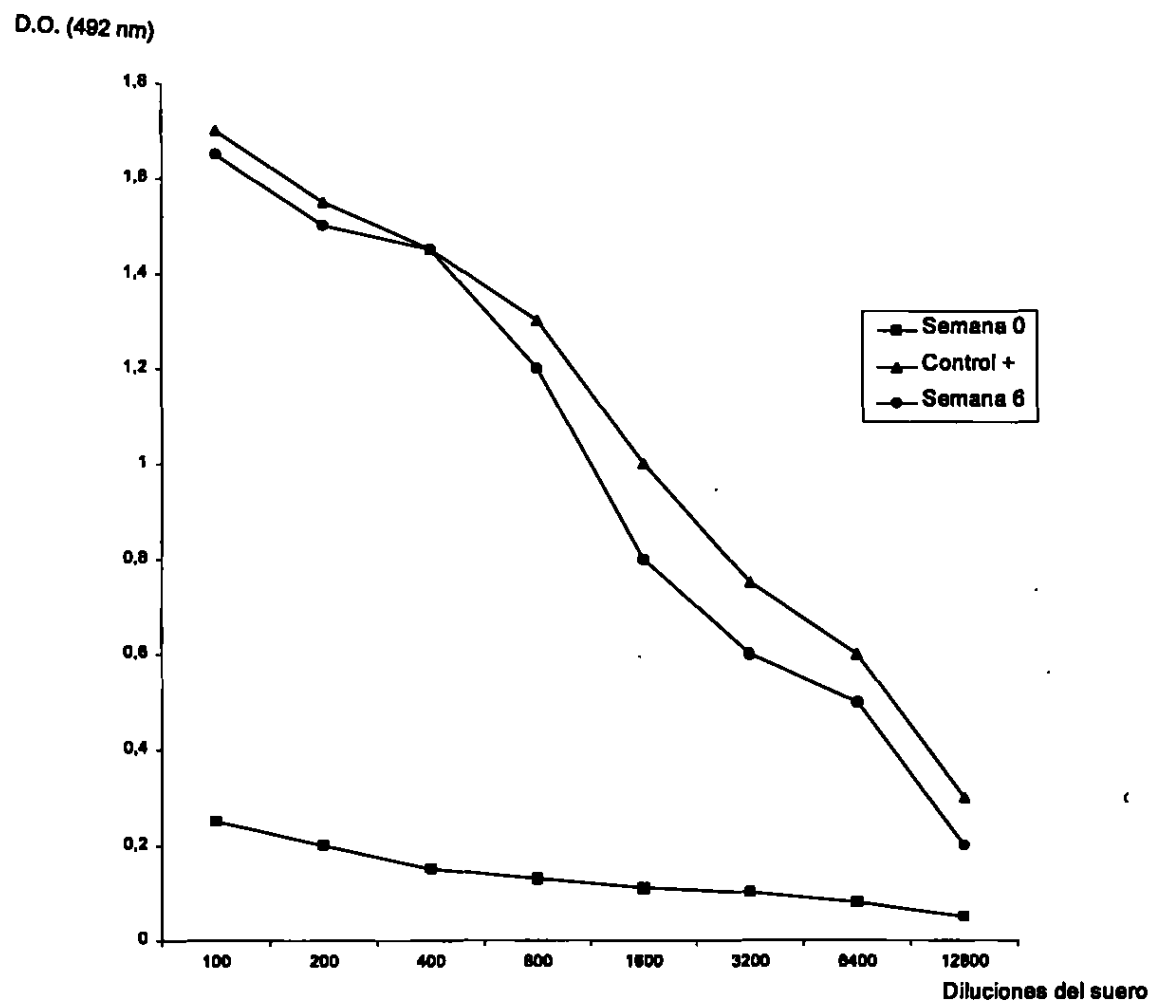
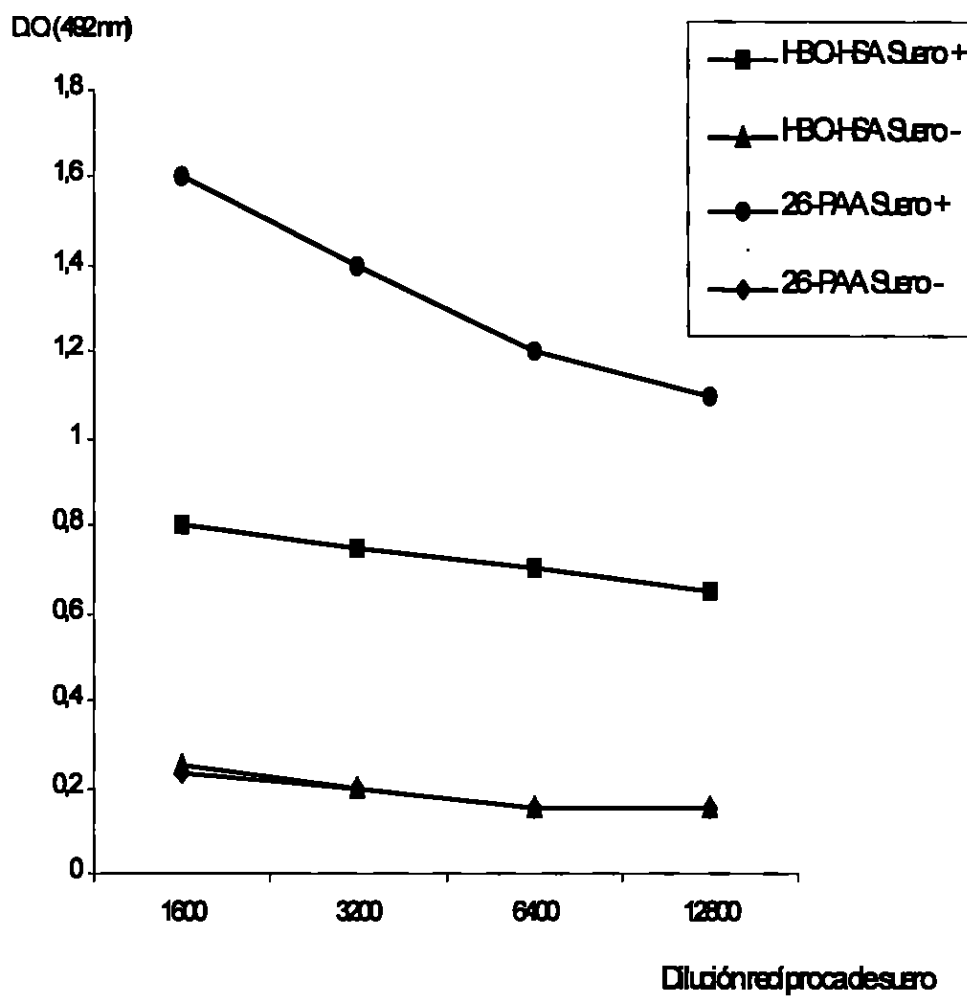


Figura 6



① Las folias 54 a 59 son tarjetas y extracto de publicar 25020.124.

EXTRACTO

(21) No. SOLICITUD 00-64095.

(51) INT.CI. A61K³¹/6615, ³¹/7028.

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN 28-Ago-2000.

(71) SOLICITANTE
 UNIVERSIDAD DE LA HABANA,
 MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR

(30) PRIORIDAD

(31) No. DE SOLICITUD CU 121/99

(72) INVENTORES
 1. VEREZ BENCOMO, Vicente Guillermo
 2. ROY, Rene

(32) FECHA DE PRESENTACIÓN 30-ago-99

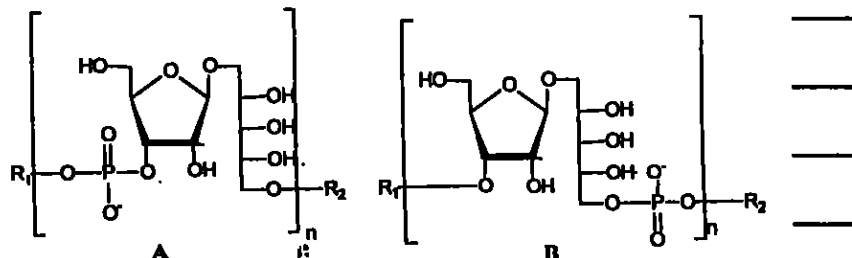
(74) APODERADO Dr. MARGARITA CASTELLANOS
 ABONDANO

(33) PAÍS CUBA

(54) TÍTULO " OLIGOSACARIDOS DERIVADOS DE RIBOSA-RIBITOL-FOSFATO Y VACUNAS QUE LOS CONTIENEN "

(57) RESUMEN

Mezclas de oligosacáridos que comprenden unidades repetitivas de fórmula (fosfato-ribosa-ribitol)n o (ribosa-ribitol - fosfato) n caracterizadas porque dichas mezclas son obtenidas mediante síntesis y comprenden al menos 5 compuestos de estructura A ò B siendo n un valor comprendido entre 4 y 25, y donde R₁ ò R₂ es un espaciador para la conjugación a un carrier, con la condición que R₁= espaciador si R₂=H, ò R₂= espaciador si R₁=H.



Procedimiento para sintetizar una mezcla de oligosacáridos que comprende unidades repetitivas de fórmula (fosfato - ribosa- ribitol) n o (ribosa- ribitol - fosfato) n caracterizado porque se efectúa una reacción de policondensación de una sola etapa aplicada al derivado disacárido 19 o 23 en presencia de un promotor en un solvente básico y con un espaciador que interviene en la reacción como aceptor deteniendo el crecimiento de la cadena del oligómero.

Método para la síntesis del disacárido intermediario 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 ribofuranosa seguido de desacetilación para dar lugar al compuesto 4 que se somete a purificación

ARTE FINAL

TAMAÑO 6 X 6

por adsorciòn-desorciòn en silicagel.

Mètodo para sintetizar el disacàrido intermedio 17 que comprende un procedimiento de dibencilaciòn del disacàrido 4 con òxido de dibutilestaño, yoduro de tetrabutylamonio, hidruro de sodio y cloruro de bencilo en una relaciòn 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 fòrmula 5, seguido de isomerizaciòn del alilo a propenilo.

Disacàrido 5-O-propenil-2,3,4-tri-O-bencil-1-O-(2',5'-di-O-bencil-β-D-ribo-furanosil)-
D-ribitol 17 obtenido como intermedio en la síntesis de los derivados 19 y 23.

Derivados disacarídicos 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 obtenidos como intermedios claves en la reacciòn de oligomerizaciòn de las reivindicaciones de la 4 a la 9.

Mètodo para preparar los disacàridos 19 ò 23 a partir del disacàrido 17, que comprende un procedimiento de fosfonilaciòn con tricloruro de fosforo-imidazol seguido de hidròlisis del propenilo, o acetilaciòn, hidròlisis del propenilo, fosfonilaciòn con tricloruro de fosforo-imidazol seguido de desacetilaciòn.

68
56

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO	
Radicación : 00064095 00000000	Folios: 59
Fecha (AND): 2000-08-28 14:49:59	
Trámite : 002 PATENTES D	1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- | | |
|---|-----|
| • Nombre e identificación del Solicitante | [1] |
| • Nombre e identificación del Inventor | [1] |
| • Título o nombre de la Invención | [1] |
| • Descripción | [5] |
| • Reivindicaciones | [4] |
| • Resumen | [6] |
| • Comprobante de Pago | [4] |

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- | | |
|--|-----|
| • Nombre e identificación del peticionario | [] |
| • Nombre e identificación del inventor o diseñador | [] |
| • Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse | [] |
| • Representación gráfica | [] |
| • Comprobante de pago | [] |

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 2740-490 y 49
Commutador 334 12 21-2 3-0
Fax: 281 31 25 ext. 406/407/408/409/410
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

57

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-64095

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- | | | |
|--|--|--|
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a). |
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94). |
| SI ☒ | NO ☐ | NO APLICABLE ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000) |
| SI ☒ | NO ☐ | EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris. |
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional. |
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de Paris; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.). |
| SI ☐ | NO ☒ | CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS |

OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: Deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Bogotá, D.C., 29 de Agosto del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.

202022

1º EXAMEN DE FORMA

Radicación n° 00064095

CONCEPTO TÉCNICO N° 1903

Clasificación Internacional Patentes: A61K³¹/₆₆₁₅, ³¹/₇₀₂₈ ⁽¹⁾

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- | | |
|--|---|
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene una o más reivindicaciones. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94). |
| SI ☒ NO ☐ | CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS |

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☐ NO ☒ ver hoja(s) anexa(s)

Bogotá, D.C., 20 de noviembre de 2000.

202012

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-64095

AUTO 3054

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérsele al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los

21 NOV. 2000

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMERZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 23 NOV 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

202022