

REIVINDICACIONES:

1. Un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido que comprende un polisacárido capsular de estreptococo grupo B (GBS) y una proteína portadora, en donde el polisacárido capsular tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %, mayor de alrededor de 95 % o de alrededor de 100 %.
2. El conjugado inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX.
3. El conjugado inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde los polisacáridos capsulares tienen al menos alrededor de 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.
4. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el polisacárido capsular tiene un peso molecular de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa, o de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa.
5. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el peso molecular del conjugado es de alrededor de 300 kDa a alrededor de 20.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 15.000 kDa, o de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 10.000 kDa.
6. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación de alrededor de 0 % a alrededor de 40 %.
7. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación menor de alrededor de 5 %, menor de alrededor de 4 %, menor de alrededor de 3 %, menor de alrededor de 2 % o menor de alrededor de 1 %.
8. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polisacárido capsular tiene al menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,35 o alrededor de 0,4 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
9. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polisacárido capsular tiene menos de alrededor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 o 0,05 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.

10. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇ o toxoide tetánico.
11. El conjugado inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇.
12. Un método para aislar un polisacárido capsular, que comprende hacer reaccionar un reactivo orgánico con un cultivo celular que comprende una bacteria productora de polisacárido capsular.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la bacteria no se lisa.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde la bacteria se inactiva por calor.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde el método también comprende la etapa de centrifugación para proporcionar una pasta celular.
16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde el método también comprende la etapa de filtración.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha etapa de filtración es una diafiltración.
18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en donde la bacteria productora de polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.
19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde las bacterias son *Streptococcus agalactiae*.
20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-19, en donde los reactivos orgánicos son compuestos de hidroxilamina derivatizados.
21. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-20, en donde la hidroxilamina es cualquier hidroxilamina enumerada en la Tabla 2 del Ejemplo 2.
22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-21, en donde la hidroxilamina se selecciona del grupo que consiste en dibencil hidroxilamina; dietil hidroxilamina; hidroxilamina; etilendiamina; trietilentetramina; 1,1,4,7,10,10 hexametil trietilentetramina; y 2,6,10,trimetil 2,6,10 triazaundecano.

23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-22, en donde la concentración de hidroxilamina es de alrededor de 5 mM a alrededor de 200 mM.

24. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-23, en donde el pH de la reacción es de alrededor de 5,5 a alrededor de 9,5.

25. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-24, en donde la reacción se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 20 °C a alrededor de 85 °C.

26. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-26, en donde el tiempo de reacción es de alrededor de 10 horas a alrededor de 90 horas.

27. Un método para obtener el conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el polisacárido capsular se aísla de acuerdo con el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-26.

28. Un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido que comprende un polisacárido capsular preparado mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-26.

29. Una composición inmunógena que comprende el conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la reivindicación 28.

30. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B (GBS) serotipo IV y al menos un serotipo adicional seleccionado del grupo que consiste en Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX.

31. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de GBS serotipos Ia, Ib, II, III y IV.

32. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de GBS serotipos Ia, Ib, II, III y V.

33. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de GBS serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V.

34. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido que comprenden al menos cuatro serotipos de polisacárido capsular de GBS seleccionados del grupo que consiste en Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX.

35. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la composición comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo V.

36. La composición inmunógena de acuerdo con las reivindicaciones 34 o 35, en donde la composición no tiene interferencia inmunitaria.

37. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-36, en donde la composición también comprende un excipiente, un amortiguador, un estabilizante, un adyuvante, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación de radicales libres, un portador aceptables desde el punto de vista farmacéutico, o una mezcla de estos.

38. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-37, en donde la composición también comprende un amortiguador.

39. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 38, en donde el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en HEPES, PIPES, MES, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato.

40. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el amortiguador es histidina.

41. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-40, en donde la composición también comprende un tensioactivo.

42. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 41, en donde el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en ésteres de ácidos grasos de polioxietilén sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 60, polisorbato 40, polisorbato 20 y alquiléteres de polioxietileno.

43. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 42, en donde el tensioactivo es polisorbato 80.

44. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-43, en donde la composición también comprende un excipiente.

45. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el excipiente se selecciona del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol.

46. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 45, en donde

el excipiente es cloruro de sodio.

47. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-46, en donde la composición también comprende un adyuvante.

48. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 47, en donde el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio o QS-21.

49. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 48, en donde el adyuvante a base de aluminio se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, hidroxil fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

50. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 49, en donde el adyuvante es fosfato de aluminio.

51. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 49, en donde el adyuvante es hidroxil fosfato de aluminio.

52. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-51, en donde la composición comprende un amortiguador, un tensioactivo, un excipiente, y de manera opcional, un adyuvante, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0.

53. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-52, en donde la composición comprende histidina, polisorbato 80, cloruro de sodio, y de manera opcional, fosfato de aluminio, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0.

54. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-53, en donde la composición comprende alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,03 % (v/p) de polisorbato 80, alrededor de 10 mM a alrededor de 250 mM de cloruro de sodio, y de manera opcional, alrededor de 0,25 mg/ml a alrededor de 0,75 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio.

55. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-54, en donde la composición comprende una dosis de alrededor de 5 mcg/ml a alrededor de 50 mcg/ml.

56. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-55, en donde la composición se liofiliza, opcionalmente en presencia de al menos un excipiente.

57. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 56, en donde

al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol.

58. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos un excipiente es sacarosa.

59. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 56-58, en donde la composición comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) de al menos un excipiente.

60. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 56-59, en donde la composición comprende un excipiente adicional.

61. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el excipiente adicional es manitol o glicina.

62. La composición inmunógena de acuerdo con las reivindicaciones 60 o 61, en donde la composición comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) del excipiente adicional.

63. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-66, en donde la composición se reconstituye con agua, agua para inyección (WFI), una suspensión de adyuvante o solución salina.

64. Una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63 para usar como medicamento.

65. Una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63 para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra GBS en un sujeto.

66. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 65, en donde el sujeto es una hembra que planea quedar preñada o una hembra preñada.

67. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 66, en donde la hembra se encuentra en la segunda mitad de la preñez, al menos en la semana 20 de gestación, o en la semana 27 a 36 de gestación.

68. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 65, en donde el sujeto es un adulto de 50 años o más, 65 años o más, y 85 años o más.

69. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 65-68, en donde el sujeto está inmunodeprimido.

70. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el sujeto tiene una afección seleccionada del grupo que consiste en obesidad, diabetes, infección por VIH, cáncer, enfermedad cardiovascular o enfermedad hepática.

71. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 65-70, en donde el estreptococo grupo B es *Streptococcus agalactiae*.

72. Un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el estreptococo grupo B, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63.

73. Un método para prevenir o reducir una enfermedad o afección asociada al estreptococo grupo B en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63.

74. El método de acuerdo con las reivindicaciones 72 o 73, en donde el sujeto es una hembra que planea quedar preñada o una hembra preñada.

75. El método de acuerdo con la reivindicación 74, en donde la hembra se encuentra en la segunda mitad de la preñez, al menos en la semana 20 de gestación, o en la semana 27 a 36 de gestación.

76. El método de acuerdo con las reivindicaciones 72 o 73, en donde el sujeto es un adulto de 50 años o más, 65 años o más, y 85 años o más.

77. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 72-76, en donde el sujeto está inmunodeprimido.

78. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el sujeto tiene una afección seleccionada del grupo que consiste en obesidad, diabetes, infección por VIH, cáncer, enfermedad cardiovascular o enfermedad hepática.

79. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 72-78, en donde el estreptococo grupo B es *Streptococcus agalactiae*.

80. Un anticuerpo que se fija a un polisacárido capsular en el conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 28.

81. Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 80.

82. Un método para producir un anticuerpo, que comprende administrar la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63 a un sujeto.

83. Un anticuerpo producido mediante el método de acuerdo con la reivindicación 82.

84. Un método para conferir inmunidad pasiva a un sujeto, que comprende las etapas de:

(a) generar una preparación de anticuerpos usando la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63; y

(b) administrar la preparación de anticuerpos al sujeto para conferir inmunidad pasiva.

85. Un método para obtener un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la reivindicación 28, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido capsular de GBS con un agente oxidante, lo que da como resultado un polisacárido activado; y

(b) hacer reaccionar el polisacárido activado con una proteína portadora, lo que da como resultado un conjugado proteína-polisacárido.

86. El método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde la etapa (b) se lleva a cabo en un solvente aprótico polar.

87. El método de acuerdo con la reivindicación 86, en donde el solvente se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), sulfolano, dimetilformamida (DMF) y hexametilfosforamida (HMPA).

88. El método de acuerdo con la reivindicación 87, en donde el solvente es dimetilsulfóxido (DMSO).

89. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-88, en donde el polisacárido se hace reaccionar con 0,01 a 10,0 equivalentes molares del agente oxidante.

90. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-89, en donde el agente oxidante es periodato.

91. El método de acuerdo con la reivindicación 90, en donde el periodato es periodato de sodio.

92. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-91, en donde la reacción de oxidación de la etapa (a) dura entre 1 hora y 50 horas.

93. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-92, en donde la temperatura de la reacción de oxidación se mantiene entre alrededor de 2 °C y alrededor

de 25 °C.

94. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-93, en donde la reacción de oxidación se lleva a cabo en un amortiguador seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES) y Bis-Tris.

95. El método de acuerdo con la reivindicación 94, en donde el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM.

96. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-95, en donde la reacción de oxidación se lleva a cabo a un pH de alrededor de 4,0 a alrededor de 8,0.

97. El método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde el agente oxidante es 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO).

98. El método de acuerdo con la reivindicación 97, en donde N-clorosuccinimida (NCS) es un cooxidante.

99. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-98, en donde la etapa (a) también comprende inactivar la reacción de oxidación agregando un agente de inactivación.

100. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-99, en donde la concentración de polisacárido es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml.

101. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-100, en donde el grado de oxidación del polisacárido activado es entre 5 y 25.

102. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-101, en donde el método también comprende la etapa de liofilizar el polisacárido activado.

103. El método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde el polisacárido activado se liofiliza en presencia de un sacárido seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita.

104. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-103, en donde la etapa (b) comprende:

(1) formular un compuesto con el polisacárido activado y una proteína portadora, y

(2) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS.

105. El método de acuerdo con la reivindicación 104, en donde la concentración

de polisacárido activado en la etapa (2) es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml.

106. El método de acuerdo con las reivindicaciones 104 o 105, en donde la relación inicial (peso en peso) de polisacárido activado con respecto a la proteína portadora es entre 5:1 y 0,1:1.

107. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-106, en donde el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio y zinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, piridina borano, 2-picolino borano, 2,6-diboran-metanol, dimetilamin-borano, t-BuMeⁱPrN-BH₃, bencilamin-BH₃ o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB).

108. El método de acuerdo con la reivindicación 107, en donde el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

109. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-108, en donde la cantidad de agente reductor es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares.

110. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-109, en donde la reacción de reducción de la etapa (2) dura entre 1 hora y 60 horas.

111. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-110, en donde la temperatura de la reacción de reducción se mantiene entre 10 °C y 40 °C.

112. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-111, en donde el método también comprende una etapa (etapa(c)) de bloqueo de aldehído sin reaccionar mediante la adición de un borohidruro.

113. El método de acuerdo con la reivindicación 112, en donde la cantidad de borohidruro es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares.

114. El método de acuerdo con la reivindicación 112, en donde el borohidruro se selecciona del grupo que consiste en borohidruro de sodio (NaBH₄), cianoborohidruro de sodio, borohidruro de litio, borohidruro de potasio, borohidruro de tetrabutilamonio, borohidruro de calcio y borohidruro de magnesio.

115. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde el borohidruro es borohidruro de sodio (NaBH₄).

116. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 112-114, en donde la etapa de bloqueo dura entre 0,1 horas y 10 horas.

117. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 112-116, en

donde la temperatura de la etapa de bloqueo se mantiene entre alrededor de 15 °C y alrededor de 45 °C.

118. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-117, en donde el método también comprende la etapa de purificación del conjugado proteína-polisacárido.

119. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-118, en donde el conjugado proteína-polisacárido comprende menos de alrededor de 40 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido.

120. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-119, en donde la relación (peso en peso) de polisacárido con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,5 a alrededor de 3,0.

121. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-120, en donde el grado de conjugación del conjugado es entre 2 y 15.

122. Un método para obtener un conjugado proteína-polisacárido, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido capsular de GBS aislado con un agente oxidante;

(b) inactivar la reacción de oxidación de la etapa (a) agregando un agente de inactivación que da como resultado un polisacárido capsular de GBS activado;

(c) formular un compuesto con el polisacárido capsular de GBS activado y una proteína portadora,

(d) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido capsular de GBS activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS, y

(e) bloquear el aldehído sin reaccionar mediante la adición de borohidruro de sodio (NaBH_4),

en donde las etapas (c) y (d) se llevan a cabo en DMSO.