

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 248**

51 Int. Cl.:

**C07H 11/04** (2006.01)  
**A61K 39/095** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**C07H 7/00** (2006.01)  
**C07H 13/00** (2006.01)  
**C07H 15/04** (2006.01)  
**A61K 31/702** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2006 E 06765581 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 1885734**

54 Título: **Inmunógenos para vacunas contra Meningitidis A**

30 Prioridad:

**06.05.2005 US 678289 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.04.2015**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (33.3%)**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH;**  
**OSCARSON, STEFAN (33.3%) y**  
**TEODOROVIC, PETER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**OSCARSON, STEFAN;**  
**TEODOROVIC, PETER y**  
**COSTANTINO, PAOLO**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 533 248 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## Inmunógenos para vacunas contra *Meningitidis A*

### Descripción

#### 5 Campo técnico

La invención se refiere a un compuesto útil para una vacuna contra la meningitis A. Más particularmente, el compuesto es un oligosacárido que comprende un enlace que contiene fósforo estabilizado, preferentemente un enlace fosfonato. El compuesto contiene más preferentemente unidades de manosa y también puede contener un espaciador en la configuración alfa en C-1 de la unidad de manosa. La invención también incluye métodos de preparación del oligosacárido y métodos mejorados de preparación de compuestos y productos intermedios que contienen manosa.

#### 15 Técnica anterior

La meningitis es una infección de las meninges, el fino revestimiento que rodea el cerebro y la médula espinal. Varios tipos de bacterias pueden producir la meningitis, y *N. meningitidis* es una de las más importantes. Otras son *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b. Hay varios subgrupos de *N. meningitidis*, que se diferencian por la estructura del polisacárido capsular que rodea la bacteria.

La meningitis se produce tanto por virus como por bacterias. Los dos tipos principales de bacterias que causan la meningitis son *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. En el caso de *H. influenzae* solo un serotipo, el tipo b, es importante, mientras que con *N. meningitidis* se han identificado doce serogrupos, de los que los grupos A, B, C y W135 son conocidos por producir epidemias. Los diversos serotipos tienen diferente prevalencia geográfica, por ejemplo, el tipo B y C son dominantes en Europa y América del Norte y el tipo A en África y América del Sur. El serotipado se basa en la estructura y antigenicidad del polisacárido capsular (PSC) que rodea las bacterias, y el PSC también puede usarse como vacuna contra las bacterias. Pueden prepararse vacunas especialmente eficaces (vacunas de glucoconjugado) uniendo el sacárido a una proteína transportadora. Véase Plotkin, S. A. y Orenstein, W. A., *Vaccines*, 4ª ed., Saunders, páginas 959-987 (2004). Estos glucoconjugados inducen una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T con memoria y efecto también en niños pequeños, mientras que el PSC no conjugado generalmente deja de proporcionar tanto un efecto de memoria en adultos como cualquier efecto inmunogénico sustancial en lactantes. El desarrollo de vacunas tipo A se ha considerado especialmente difícil, debido a la inestabilidad inherente de los enlaces diéster de fosfato anoméricos que son parte del PSC. La unidad de repetición de tipo A es un monosacárido, 2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranososa ligada 1 $\rightarrow$ 6 mediante un puente fosfodiéster (**Figura 1**). En el polisacárido nativo, el 3-OH está acetilado a un grado de aproximadamente el 80 %. La importancia inmunológica de esta acetilación no se ha investigado completamente, pero hay indicaciones de que no es de mayor importancia.

El serogrupo A de *Neisseria meningitidis* produce brotes epidémicos de meningitis, principalmente en partes del África subsahariana en el llamado cinturón de la meningitis. En el cinturón de la meningitis, la incidencia estimada durante el periodo 1970-1992 fue aproximadamente 800.000 casos. Véase Plotkin, S. A. y Orenstein, W. A., *Vaccines*, 4ª ed., Saunders, páginas 959-987 (2004). Los brotes epidémicos de meningitis son devastadores para la región, por lo que se necesita urgentemente una vacuna eficaz. La esperanza es, por supuesto, que el desarrollo de una buena vacuna, en combinación con esfuerzos similares a aquellos contra la viruela realizados por la OMS en los años 60 y 70, pueda asimismo eliminar la meningitis causada por el serotipo A de *N. meningitidis*. Las vacunaciones son una forma mucho más rentable de controlar una enfermedad que el tratamiento con antibióticos y otras terapias, y el coste es especialmente importante en los países en vías de desarrollo.

Las vacunas preparadas a partir del recubrimiento de polisacárido sobre la bacteria, su polisacárido capsular, son eficaces en adultos. La exposición a este polisacárido hace que los adultos desarrollen una respuesta inmunogénica que protege contra la meningitis causada por *N. meningitidis*. Una gran limitación con tales vacunas es, sin embargo, que el sistema inmunitario de niños menores de dos años de edad no responde a la mayoría de los antígenos de polisacárido. Desafortunadamente, éste es el grupo de edad en mayor riesgo de meningitis bacteriana. Así, las vacunas de polisacárido no son útiles en niños jóvenes. Además, incluso en niños mayores y adultos estas vacunas solo inducen inmunidad a corto plazo. La protección disminuye rápidamente y desaparece generalmente aproximadamente dos años después de la vacunación.

Polisacáridos como los PSC de *N. meningitidis* son antígenos independientes de linfocitos T, que significa que pueden dar una respuesta inmunitaria sin la participación de linfocitos T (células derivadas del timo). Esta respuesta carece de varias propiedades importantes que caracterizan la respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T, tal como memoria inmunológica, cambio de clase de IgM a IgG y maduración por afinidad. Si la parte del polisacárido está conectada a una proteína transportadora, sin embargo, desencadena una respuesta inmunitaria celular que crea efecto de memoria, y también da protección en niños jóvenes. Tales polisacáridos ligados a proteínas transportadoras se denominan frecuentemente glucoconjugados, y son especialmente valiosos como vacunas.

Las vacunas de glucoconjugado se llaman así debido a que su producción implica la conjugación de un antígeno de

polisacárido u otro antígeno glucosídico con una proteína transportadora. El resto de sacárido en las vacunas glucoconjugadas es normalmente un PSC bacteriano funcionalizado, pero también puede ser sintético. Las estructuras de hidratos de carbono sintéticas tienen varias ventajas posibles con respecto a aquellas basadas en hidratos de carbono de fuentes naturales. Los hidratos de carbono naturalmente derivados son mezclas heterogéneas y pueden incluir pequeñas cantidades de impurezas y contaminantes naturales. A diferencia, pueden producirse hidratos de carbono sintéticos como compuestos individuales homogéneos de una manera controlada, con poca o ninguna variabilidad de lote a lote. Otra ventaja de las estructuras sintéticas es que pueden prepararse para incluir grupos funcionales para la derivatización o modificaciones del resto de hidrato de carbono que son difíciles o imposibles de realizar sobre el material nativo. La proteína transportadora es un factor importante en la modulación de la inmunogenicidad. Se han usado diversos transportadores para la conjugación, y los mejores resultados se han conseguido usando versiones desintoxicadas de proteínas fuertemente inmunogénicas como toxinas de la difteria y el tétanos, que se han autorizado para su uso en seres humanos. Véase la patente de EE.UU. n° 4.354.170. También se ha mostrado que el sistema inmunitario reacciona más eficazmente cuando los pacientes ya se han inmunizado con la proteína transportadora particular.

Una vacuna de glucoconjugado se prepara normalmente conjugando la estructura del polisacárido capsular nativo de la bacteria con una proteína transportadora adecuada. Sin embargo, ha habido problemas con ese enfoque debido a las propiedades del polisacárido que encapsula *N. meningitidis*. Su enlace fosfodiéster puede degradarse en las condiciones necesarias para la unión del polisacárido a proteínas, e incluso después de la preparación, los glucoconjugados de los PSC nativos tienden a degradarse durante el almacenamiento.

Los fosfodiésteres normalmente son bastantes estables, pero en el polisacárido capsular de *N. meningitidis*, el fosfodiéster está ligado al centro anomérico de un residuo de hidrato de carbono. Así, un oxígeno del fosfodiéster también es parte de un enlace acetal, que lo hace susceptible a la escisión hidrolítica catalizada por electrófilos tales como iones ácidos o metálicos. La escisión de este enlace degrada el polisacárido en trozos más pequeños. Desafortunadamente, durante las manipulaciones requeridas para formar un glucoconjugado, o incluso en una formulación de vacuna, el PSC de *N. meningitidis* A está sometido a tal degradación, dificultando preparar y guardar vacunas eficaces que comprenden este PSC particular.

Una forma de hacer el enlace fosfodiéster más estable es eliminar el oxígeno entre el fósforo y el oxígeno anomérico, de manera que la porción del enlace ya no sea susceptible a la escisión por hidrólisis electrófila. El oxígeno exocíclico en el centro anomérico puede sustituirse con un átomo de carbono isómero ( $\text{CH}_2$ ), que transforma el fosfodiéster en su análogo de C-fosfonato. Esto debe producir una versión estabilizada del polisacárido antigénico. Recientemente se ha publicado una investigación dirigida hacia este enfoque. Torres-Sanchez, M. I. y col., Synlett (2005) 7:1147-1151. Sin embargo, los autores no evaluaron la actividad de sus compuestos ni desvelaron un oligómero de más de dos unidades de manosa. Además, su enfoque de síntesis proporcionó solo el anomérico beta en la posición en la que el oligosacárido pretende ligarse a una proteína, mientras que el PSC nativo de *N. meningitidis* solo contiene enlaces alfa. Así, sigue existiendo la necesidad de glucoconjugados ligados en alfa que tengan enlaces estabilizados entre las unidades de manosa y de métodos para sintetizarlos.

Otro enfoque es estabilizar los enlaces fosfodiéster usando efectos inductores de sustituyentes próximos para reducir la densidad electrónica en los anoméricos de oxígeno; esto, también, debería ralentizar los mecanismos de degradación electrófilos previstos. La propiedad de atracción de electrones de los sustituyentes puede mantenerse mientras que se construye un oligosacárido, y quizás también mientras que esté conjugado con una proteína, a continuación se elimina una vez la molécula ya no necesita exponerse a condiciones destructoras.

La presente invención incluye cada uno de estos enfoques, además de combinaciones de los mismos. Así, un aspecto de la invención proporciona una síntesis eficaz de un análogo de C-fosfonato de una forma oligomérica de la unidad de repetición del polisacárido capsular de tipo A de *N. meningitidis*, necesario para el desarrollo de vacunas. Véase Bundle, D. R. y col., J. Biol Chem. (1974) 249:2275-2281. La invención proporciona particularmente métodos para introducir un resto de espaciador mediante el cual los oligosacáridos de la invención pueden conjugarse con una proteína para preparar una vacuna de glucoconjugado, y orienta el resto de espaciador en la configuración anomérica alfa. La **Figura 2** ilustra un compuesto que tiene la configuración alfa deseada en este centro y uno que tiene la configuración beta. Como el PSC natural del organismo diana es un oligómero completamente ligado en alfa de unidades de manosa, es especialmente deseable proporcionar la misma configuración ligada en alfa en un inmunógeno sintético. Aunque todos los enlaces entre unidades de manosa en una porción sintética de oligómero de un glucoconjugado están en la configuración alfa, la configuración en el centro mediante la cual se enlazan los oligosacáridos a la proteína puede ser particularmente influyente sobre los efectos inmunogénicos cuando la porción de oligosacárido del glucoconjugado contiene menos de aproximadamente 10 unidades de manosa.

Así, la presente invención proporciona tales compuestos y métodos para la preparación de estos compuestos. La etapa de acoplamiento crucial se realiza frecuentemente usando un monoéster de C-fosfonato y condiciones de Mitsunobu. Aunque puede ser poco práctico preparar polisacáridos que compitan con el PSC natural en tamaño, esto no es necesario: incluso oligosacáridos de solo algunas unidades de manosa de longitud pueden provocar una respuesta inmunitaria. Y los oligosacáridos sintéticos ofrecen las ventajas de mecanismos de enlace selectivos y elevada estabilidad *in vivo*, cada uno de los cuales debe potenciar su eficacia inmunogénica *in vivo*.

Otro aspecto de la invención proporciona métodos para estabilizar las unidades de manosa de manera que pueda usarse un enlace fosfodiéster, el enlace presente en el polisacárido capsular nativo. Incluye compuestos y métodos que proporcionan estabilización para facilitar la preparación de los conjugados de proteína de los oligosacáridos. La estabilización se proporciona por un grupo atrayente de electrones, una azida, en C-2 de al menos dos de las unidades de manosa en un polisacárido, que aumenta la estabilidad del polisacárido de manera que pueda conjugarse con una proteína. Después de la conjugación, la estabilización es menos importante, y en ese momento la azida se reduce normalmente a una amina y se acila, proporcionando el grupo 2-acetilamino que es parte de la unidad de manosa repetitiva en el polisacárido capsular de *N. meningitidis* A.

Cuando corresponda, también es posible mezclar los dos métodos de estabilización; así, un oligosacárido de la invención puede incluir unidades de manosa que contienen azida que están ligadas por un fosfodiéster en el centro anomérico adyacente en combinación con unidades de manosa ligadas por fosfonato. Esta combinación puede proporcionar estabilización adicional, dependiendo de la orientación del fosfonato; o puede proporcionar ventajas sintéticas tales como elevados rendimientos y puede evitar complicaciones que puede producir el sustituyente de acetilamina.

En otros aspectos, la invención proporciona métodos para sintetizar precursores clave para estos compuestos, composiciones farmacéuticas que los contienen, y métodos para usarlos para fabricar un medicamento. Los compuestos, composiciones y medicamentos pueden administrarse a un sujeto para inducir una respuesta inmunogénica en el sujeto, que normalmente es un ser humano.

#### Divulgación de la invención

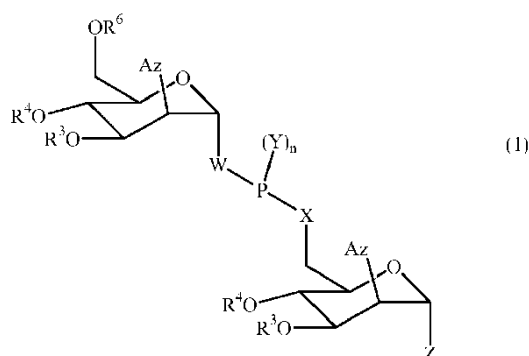
La invención proporciona un oligosacárido que comprende una primera unidad de manosa y una segunda unidad de manosa, en el que la primera unidad de manosa comprende un resto de espaciador en la configuración alfa en C-1, espaciador que puede conjugarse con una proteína, en el que la primera unidad de manosa está conectada a la segunda unidad de manosa mediante un enlace 1,6 que conecta C-6 de la primera unidad con C-1 de la segunda unidad, y en el que el enlace 1,6 comprende un fosfonato. También se proporciona por la invención un método para preparar un oligosacárido, método que comprende: ligar un primer resto que comprende al menos una unidad de manosa sustituida con aza mediante un enlace 1,6 que comprende un fosfonato con un segundo resto que comprende al menos una unidad de manosa sustituida con aza, en el que el primer resto comprende un resto de espaciador, resto de espaciador que está ligado a C-1 de una unidad de manosa en la configuración alfa.

En el presente documento se desvelan métodos de uso de un oligosacárido en vacunas para proporcionar protección contra infección por la bacteria *Neisseria meningitidis* A.

En algunas realizaciones, el oligosacárido comprende al menos tres unidades de manosa ligadas en secuencia, cada uno de las cuales normalmente está sustituida en N. Aunque los compuestos pueden contener cualquier número de unidades de manosa, en realizaciones preferidas la porción de oligosacárido de la molécula tiene un peso molecular inferior a 2000. Así, preferentemente, los compuestos de la invención incluyen aproximadamente dos a diez unidades de manosa ligadas en serie, preferentemente aproximadamente tres a siete.

Los compuestos de la invención están adaptados para conjugarse con una proteína, ya que las formas de glucoconjugado son inmunógenos mucho más eficaces para fines de vacunación: provocan respuestas inmunogénicas en lactantes, y provocan respuestas celulares que proporcionan un efecto de memoria para prolongar la eficacia de la vacunación. Así, los compuestos comprenden un resto de espaciador que está unido a la primera unidad de manosa en una cadena de unidades de manosa. La unidad de espaciador está específicamente diseñada para proporcionar un medio para la conjugación del oligosacárido con una proteína, o para proporcionar un medio para encapuchar la unidad de sacárido terminal, de forma que no sea reactivo, por ejemplo, para las posteriores reacciones de alargamiento/modificación de la cadena. Normalmente, este resto de espaciador posee un grupo amina, carboxilato o hidroxilo para acoplarse con un grupo complementario sobre un transportador de proteína, pero también están incluidos otros grupos conocidos en la técnica para proporcionar una forma de conjugar un oligosacárido con una proteína. Alternativamente, el resto de espaciador posee un grupo protector o de encapuchado, tal como un grupo alquilo, arilo o acilo, además de otros bien conocidos en la materia y/o desvelados en el presente documento. En compuestos de la invención, este resto de espaciador está en la configuración alfa de manera que se parezca mucho a los enlaces en el PSC natural de *N. meningitidis* y no interfiera con el efecto inmunogénico deseado, incluso en oligosacáridos cortos de la invención.

Los compuestos de la invención frecuentemente comprenden la estructura mostrada en la fórmula (1):

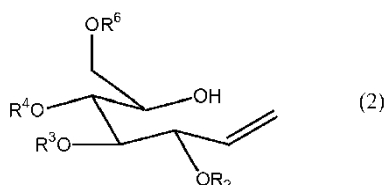


15 en la que cada Az representa un sustituyente aza;  
 cada  $R^3$  y  $R^4$  representa independientemente H o un grupo protector;  
 $R^6$  representa H, un grupo protector, o un conector unido a otra unidad de sacárido;  
 uno de W y X es O, y el otro de W y X es  $CH_2$ ;  
 n es 2;  
 20 Y es =O y el otro Y es OR,  
 en el que R es H, alquilo C1-C6, o arilo C6-C12, o aril C6-C12-alquilo, o R es M, en la que M es un catión; y  
 Z es  $OR'$ ,  $SR'$ ,  $NR'_2$ , o halógeno, en las que cada R' es independientemente H o un grupo alquilo, acilo, arilo,  
 arilalquilo, heteroalquilo, heteroacilo, heteroarilo o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido;  
 o Z representa un conector unido a otra unidad de sacárido o un resto de espaciador conjugado con una  
 25 proteína.

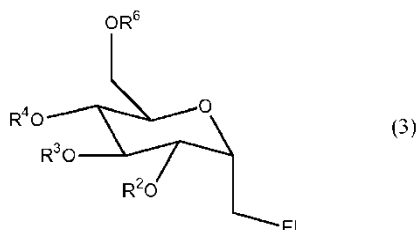
Frecuentemente en estos compuestos, X es O y W es  $CH_2$ , y Az es frecuentemente  $N_3$ ,  $NH_2$  o  $NHAc$ ; y  
 frecuentemente n es 2.

30 Los compuestos de la invención se sintetizan en parte por métodos conocidos en la técnica, pero varios métodos  
 novedosos para formar estas moléculas también son parte de la invención. Por ejemplo, el enlace 1,6-alfa en un  
 compuesto de fórmula (1) puede construirse con una reacción de Mitsunobu como se describe en el presente  
 documento. Por tanto, los sustituyentes en N tales como Az pueden insertarse como una azida por métodos  
 35 proporcionados en el presente documento, y pueden entonces reducirse para proporcionar una amina o amina  
 sustituida, que está frecuentemente en la posición 2 de una unidad de manosa, como se muestra en la fórmula (1).  
 Métodos típicos para la reducción de la azida incluyen hidrogenación catalítica y reducción con borohidruro,  
 normalmente usando cantidades catalíticas de una sal de níquel.

40 Un método para preparar unidades de manosa sustituidas con fosfonato para ensamblar los oligosacáridos también  
 se desvela en el presente documento. Por ejemplo, un compuesto de fórmula (2), que está disponible de glucosa,  
 puede convertirse en un precursor para un éster de fosfonato útil para formar el enlace 1,6-alfa que comprende el  
 fosfonato mostrado en la fórmula (1) en la que W es  $CH_2$  y X es O. El método incluye ciclar un compuesto de fórmula  
 (2) con un electrófilo



50 para formar un compuesto de fórmula (3)



60 en la que cada uno de  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^6$  es independientemente H o un grupo protector;  
 y EI representa el residuo de electrófilo.

65 El residuo de un electrófilo, EI, es la porción del reactivo electrófilo usado para iniciar el ciclado que sigue unida al

carbono. El pueden entonces sustituirse, tanto directamente como indirectamente, con un grupo que contiene fósforo tal como un grupo fosfonato por los métodos descritos en el presente documento. Esto proporciona un derivado de glucosa en vez de una unidad de manosa sustituida en N<sub>2</sub>, es decir, tiene la estereoquímica errónea en C-2; así, la invención proporciona además métodos para convertir OR<sup>2</sup> en la fórmula (2) o fórmula (3) en un grupo Az que tiene la estereoquímica apropiada desplazando una forma activada del oxígeno de OR<sup>2</sup> con una azida. El método comprende una reacción de Mitsunobu, que normalmente usa una fosforilazida como fuente de azida.

En el presente documento se desvela un método para preparar una 2-azido-2-desoxi-D-manopiranososa, método que comprende formar un triflato en la posición 2 de un derivado de glucopiranososa protegido en 1,3,4,6-tetra; y desplazar el triflato con un nucleófilo de azida. En algunos métodos, el derivado de glucopiranososa protegido en 1,3,4,6-tetra es una 1,3,4,6-tetra-O-acilglucopiranososa, que está fácilmente disponible. Véanse, por ejemplo, Helferich, B. y col., Ber. Dtsch Chem. Ges. (1962) 95:2604-2611. Alguna veces se prefiere la 1,3,4,6-tetra-O-acetilglucopiranososa.

La actividad inmunogénica de compuestos y composiciones que comprenden los oligosacáridos descritos en el presente documento se potencia frecuentemente por conjugación del oligosacárido con una proteína. Así, en muchas realizaciones, la invención incluye conjugar el oligosacárido con una proteína mediante un resto de espaciador unido al carbono C-1 de la primera unidad de manosa en la cadena. En algunas realizaciones, la proteína es una elegida por su capacidad para potenciar la respuesta inmunogénica en un ser humano, y los toxoides desintoxicados de difteria y tétanos se usan frecuentemente. Así, los compuestos de la invención incluyen frecuentemente un resto de espaciador, que puede ser Z en la fórmula (1) o puede unirse a cualquiera de los grupos hidroxilo disponibles o sustituyentes de N sobre las unidades de manosa, y que facilita la unión a una proteína. Normalmente, la conexión con la proteína es mediante Z, así Z es frecuentemente un resto de espaciador que puede conjugarse con una proteína. En muchos de los compuestos de la invención, Z está en una forma protegida. Grupos protectores adecuados dependen de la naturaleza exacta de Z, y la selección y uso de tales grupos protectores está dentro de la experiencia habitual en la materia. Ejemplos de tales grupos protectores y detalles de su uso están disponibles en, por ejemplo, Greene, T. W., y Wuts, P. G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 2<sup>a</sup> ed. (1991). Similarmente, la invención proporciona métodos para usar Z para conectar el oligosacárido con una proteína para producir una composición inmunogénica.

La invención también proporciona composiciones de vacuna que comprenden un oligosacárido de la invención, que son útiles para provocar una respuesta inmunogénica en un mamífero. Normalmente, el mamífero es un sujeto humano ya que se cree que *N. meningitidis* es patógeno solo en seres humanos, pero el provocar una respuesta inmunitaria en otros mamíferos es de valor, también, y puede usarse para proporcionar componentes inmunitarios tales como anticuerpos. Así, la invención proporciona composiciones inmunogénicas; también se desvelan métodos para usar éstas para provocar una respuesta inmunogénica en un mamífero.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la estructura del polisacárido capsular de *N. meningitidis* A.

La Figura 2 es una ilustración de los anómeros alfa y beta en el centro mediante los cuales el oligosacárido está conjugado con una proteína para potenciar su inmunogenicidad.

La Figura 3 muestra la estrategia de ensamblaje modular para los oligosacáridos sintéticos.

La Figura 4 muestra la relación entre las respuestas del anticuerpo específico inducidas por glucoconjugado sintético y el conjugado de oligosacárido de control a diferentes dosis de vacuna.

#### Modos de llevar a cabo la invención

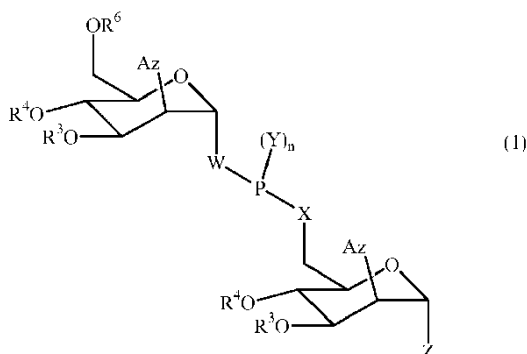
En un aspecto, la invención proporciona un oligosacárido que comprende una primera unidad de manosa y una segunda unidad de manosa, en el que la primera unidad de manosa comprende un espaciador en la configuración alfa en C-1. Este espaciador puede conjugarse con una proteína, y la primera unidad de manosa está conectada a la segunda unidad de manosa mediante un enlace 1,6 que conecta C-6 de la primera unidad con C-1 de la segunda unidad de manosa. El enlace 1,6 comprende un fosfonato. En algunas realizaciones, el enlace 1,6 está en la configuración alfa. En algunas de estas realizaciones, la primera unidad de manosa es un derivado de manosa sustituido con 2-desoxi-2-aza, y en algunas de las realizaciones la segunda unidad de manosa es un derivado de manosa sustituido con 2-desoxi-2-aza. Ciertas realizaciones tienen dos o tres, o más de tres de estas unidades de manosa sustituidas con 2-aza.

En algunas de las realizaciones de la invención, el enlace 1,6 es de la forma [C-1 de la segunda unidad de manosa]-CH<sub>2</sub>-P-O-[C-6 de la primera unidad de manosa], es decir, el carbono del fosfonato está conectado a C-1 de la segunda unidad de manosa y un oxígeno del éster de fosfonato está unido a C-6 de la primera unidad de manosa. Estas unidades de manosa están opcionalmente protegidas, y en muchas realizaciones una o ambas de estas dos unidades de manosa comprenden un sustituyente 2-aza que está seleccionado de NH<sub>2</sub>, NHAc y N<sub>3</sub>. Si estas realizaciones incluyen una tercera unidad de manosa, algunas veces está conectada con la segunda unidad de manosa por un enlace que comprende fósforo, y en el que el enlace conecta C-6 de la segunda unidad de manosa con C-1 de la tercera unidad de manosa. Este enlace comprende frecuentemente un fosfonato, que está frecuentemente ligado con la segunda unidad de manosa mediante un enlace de éster de fosfonato, y con la tercera

unidad de manosa mediante un enlace P-C del fosfonato.

En otros aspectos, la invención proporciona un oligosacárido de fórmula (1):

5



10

15

20

25

30

en la que cada Az representa un sustituyente aza;  
 cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> representa independientemente H o un grupo protector;  
 R<sup>6</sup> representa H, un grupo protector, o un conector unido a otra unidad de sacárido;  
 uno de W y X es O, y el otro de W y X es CH<sub>2</sub>;  
 n es 2;  
 Y es =O y el otro Y es OR,  
 en el que R es H, alquilo C1-C6, o arilo C6-C12, o aril C6-C12-alquilo, o R es M, en la que M es un catión; y  
 Z es OR', SR' o NR'<sub>2</sub>, en las que cada R' es independientemente H o un grupo alquilo, acilo, arilo, arilalquilo,  
 heteroalquilo, heteroacilo, heteroarilo o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido;  
 o Z representa un conector unido a otra unidad de sacárido o un resto de espaciador conjugado con una  
 proteína.

35

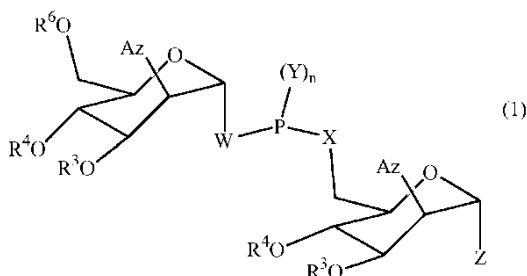
En algunas realizaciones, los compuestos que comprenden la fórmula (1) están conjugados con una proteína mediante un enlace amida o éster. Frecuentemente, en los compuestos de fórmula (1), W es CH<sub>2</sub> y X es O, y en muchas de tales realizaciones, Az es NHAc. Por tanto, en muchas realizaciones de este aspecto, R es M y Z comprende -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH- en la que n es 2-6. En realizaciones de estos compuestos basados en la fórmula (1), cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es independientemente H o Ac. Frecuentemente, R<sup>3</sup> es Ac, y opcionalmente tanto R<sup>3</sup> como R<sup>4</sup> son tanto H como Ac.

40

45

En otros aspectos, la invención proporciona métodos para preparar un oligosacárido, métodos que comprenden ligar un primer resto que comprende al menos una unidad de manosa sustituida con aza mediante un enlace 1,6 que comprende un fosfonato con un segundo resto que comprende al menos una unidad de manosa sustituida con aza. El primer resto en estas realizaciones frecuentemente comprende un resto de espaciador, resto de espaciador que está ligado a C-1 de una unidad de manosa en la configuración alfa. En algunas realizaciones de estos métodos se usa una reacción de Mitsunobu para ligar C-6 de una unidad de manosa del primer resto con C-1 de una unidad de manosa del segundo resto. En muchas de las realizaciones de estos métodos, el enlace 1,6 es un enlace 1,6-alfa.

50



55

60

65

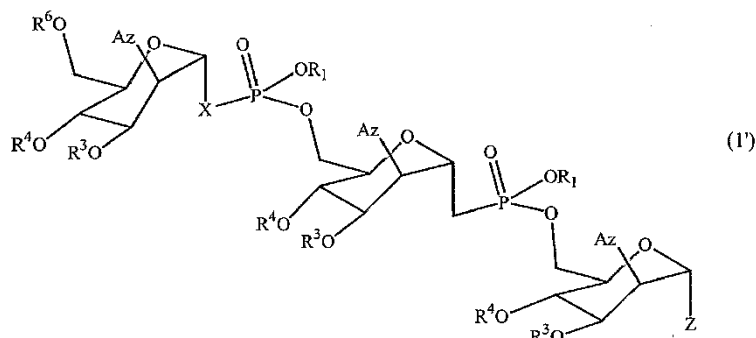
en la que cada Az representa un sustituyente aza;  
 cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> representa independientemente H o un grupo protector;  
 R<sup>6</sup> representa H, un grupo protector, o un conector unido a otra unidad de sacárido;  
 uno de W y X es O, y el otro de W y X es CH<sub>2</sub>;  
 n es 2;  
 Y es =O y el otro Y es OR,  
 en el que R es H, alquilo C1-C6, o arilo C6-C12, o aril C6-C12-alquilo, o R es M, en la que M es un catión monovalente; y

Z representa un resto que puede conjugarse con una proteína, que puede estar en forma protegida.

En algunas realizaciones del método, en los compuestos que comprenden la fórmula (1), X es CH<sub>2</sub> y W es O. En estas realizaciones, frecuentemente al menos un sustituyente aza sobre una unidad de manosa es una amina o amina sustituida que se obtiene mediante reducción de un sustituyente azida (N<sub>3</sub>). En realizaciones preferidas, la amina o amina sustituida está en la posición 2 sobre una unidad de manosa. En algunas realizaciones de estos métodos, el oligosacárido comprende un resto de espaciador que puede ser Z en un compuesto de fórmula (1), que está en el centro anomérico de una unidad de manosa. Esta unidad de espaciador puede comprender un grupo alcoxi sustituido con amina, que está opcionalmente en forma protegida. Por ejemplo, puede ser de fórmula -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-PG en la que PG representa H o un grupo protector; el grupo protector es frecuentemente un alcóxicarbonilo tal como metoxicarbonilo; t-butiloxicarbonilo; o benciloxicarbonilo. Así, NH-PG es frecuentemente un grupo carbamato.

En algunas realizaciones de estos métodos, el método comprende además ligar la segunda unidad de manosa a un sacárido adicional formando un enlace entre el oxígeno de OR<sup>6</sup> en la fórmula (1) y el sacárido adicional. Este sacárido puede ser una unidad de manosa o comprender una unidad de manosa, y en muchas realizaciones el sacárido adicional está ligado a la segunda unidad de manosa mediante un enlace 1,6-alfa. En estas realizaciones, frecuentemente R<sup>6</sup> es H o Ac y el centro anomérico de cada unidad de manosa presente está en la configuración alfa para parecerse más al PSC natural de *N. meningitidis*.

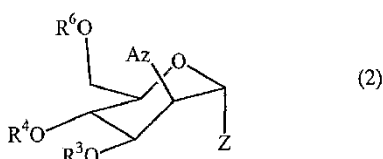
En otros aspectos, la invención proporciona un oligosacárido de fórmula (1'):



en la que cada Az está seleccionado independientemente de NH<sub>2</sub>, NHAc y N<sub>3</sub>;  
 Z representa un resto de espaciador que puede conjugarse con una proteína, y que puede estar en forma protegida o forma no protegida y que puede conjugarse con una proteína;  
 cada R<sup>1</sup> es independientemente H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido, o M, en la que M representa un catión;  
 X es O o CH<sub>2</sub>;  
 cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> está seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, Ac, Bn, y otros grupos protectores;  
 y R<sup>6</sup> es H, o un grupo protector, o un fosfato, o un enlace con una unidad de sacárido adicional.

En este aspecto de la invención, algunas realizaciones comprenden una proteína que está conjugada con el oligosacárido mediante un resto de espaciador que está en la configuración alfa en C-1 de la primera unidad de manosa. La proteína es algunas veces una toxina bacteriana inactivada seleccionada de toxoide diftérico, toxoide de pertussis, LT de *E. coli*, ST de *E. coli*, exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), o toxoide tetánico, o la proteína puede ser CRM197. La proteína en estas realizaciones puede ligarse al oligosacárido de fórmula (1) mediante un resto de espaciador, que comprende un hidroxilo o una amina, cualquiera de los cuales está opcionalmente protegido o está opcionalmente conjugado con una proteína. En algunas realizaciones de este aspecto, R<sup>3</sup> es un grupo acilo y R<sup>4</sup> es H. Las realizaciones alternativas o preferidas de fórmula (1) también se aplican a la fórmula (1').

En ciertos aspectos, la invención proporciona un método para sintetizar un oligosacárido de unidades de manosa ligadas en alfa, que comprende combinar una unidad de manosa que comprende la fórmula (2), en la que R<sup>6</sup> es acilo C1-C6 o H, y R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, Az y Z son como se definen en la reivindicación 15;

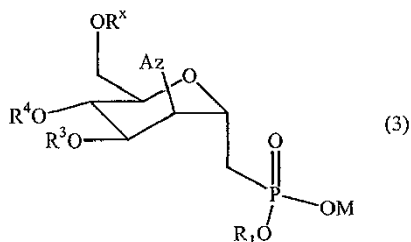


con un monómero de alargamiento de fórmula (3), en la que R<sup>x</sup> representa un grupo acilo C1-C6 y M representa H o



un catión;

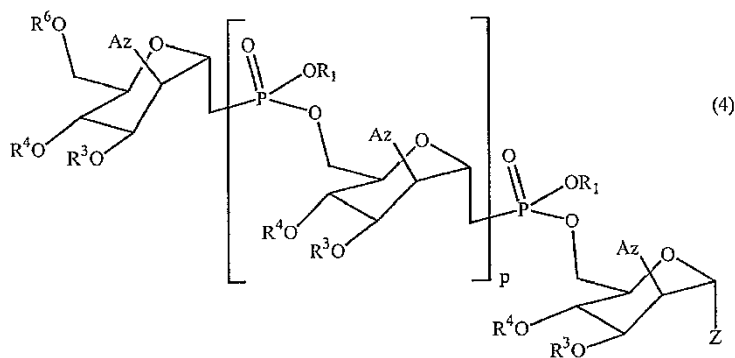
5



10

bajo condiciones de reacción de Mitsunobu, para producir un oligosacárido que comprende al menos dos unidades de manosa sustituidas con 2-aza conectadas por un enlace 1,6-alfa. En algunas realizaciones de este método, las condiciones de Mitsunobu incluyen el uso de tanto azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) como azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y tanto trifenilfosfina como una trifenilfosfina sustituida tal como tris(p-clorofenil)fosfina. En algunas realizaciones, se usan DIAD y tris(p-clorofenil)fosfina, y se usa trietilamina en exceso. En ciertas realizaciones, las condiciones de reacción de Mitsunobu se mantienen durante un periodo prolongado de tiempo, y el producto es un oligosacárido de fórmula (4)

20



25

30

35

en la que p es un número entero de 1 a 20.

40

En muchas de estas realizaciones, cada Az representa tanto NHAc como N<sub>3</sub>. En algunas de estas realizaciones, p es 1-10, y en otras, p es aproximadamente 1-5 o p es 2-4. En ciertas de estas realizaciones, los métodos de la invención incluyen adicionalmente un método para conjugar el oligosacárido de fórmula (4) con una proteína. Opcionalmente esto se hace mediante Z, que es frecuentemente un resto de espaciador seleccionado para poder conjugarse con tales proteínas. En algunas de estas realizaciones, la proteína es una toxina bacteriana inactivada seleccionada de toxoide diftérico, toxoide de pertussis, LT de *E. coli*, ST de *E. coli*, exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) o toxoide tetánico. En otras realizaciones, la proteína es CRM197.

45

En otros aspectos, la invención proporciona un oligosacárido que se prepara por los métodos anteriores. Los compuestos de oligosacárido preparados por estos métodos son compuestos inmunogénicos, y normalmente provocan una respuesta inmunogénica en un mamífero tratado que proporciona al menos inmunidad parcial a infecciones producidas por *N. meningitidis*.

50

En todavía otros aspectos, la invención proporciona un método para usar cualquier compuesto de oligosacárido de la invención para provocar una respuesta inmunogénica, normalmente por administración a un mamífero. En muchas realizaciones, estos compuestos se usan como componente de vacuna contra *Meningitidis A*; así, los métodos comprenden frecuentemente administrar una cantidad eficaz del componente de vacuna a un sujeto, proporcionando así una respuesta inmunogénica. La respuesta inmunogénica proporciona al menos resistencia o inmunidad parcial en el sujeto a meningitis producida por *N. meningitidis A*.

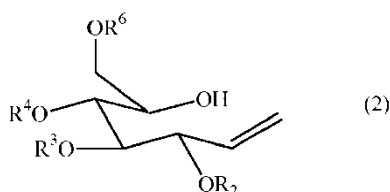
55

60

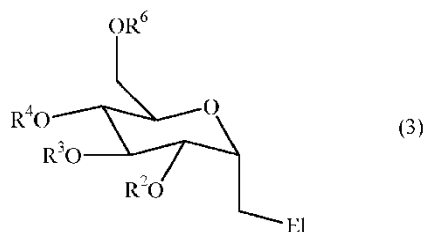
La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un oligosacárido de la invención mezclado con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para proporcionar una composición farmacéutica que es inmunogénica. En algunas realizaciones, estas composiciones son así vacunas que incluyen una vacuna contra la meningitis A que comprende cualquier compuesto de la invención. En muchas realizaciones, la vacuna comprende al menos un oligosacárido conjugado con una proteína.

65

En todavía otros aspectos, la invención proporciona métodos para preparar un derivado de manosa útil para la preparación de un oligosacárido inmunogénico, que incluye aquellos de la invención. En el presente documento también se desvelan métodos que comprenden ciclar un compuesto de fórmula (2) con un electrófilo



10 para formar un compuesto de fórmula (3)



20 en la que cada de  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^6$  es independientemente H o un grupo protector; y El representa un residuo derivado de un electrófilo.

25 Los métodos pueden incluir una etapa adicional que comprende la etapa de sustituir El con un grupo fósforo. El grupo fósforo normalmente es un fosfonato. En algunas divulgaciones se proporcionan métodos para  $OR^2$  en un compuesto de fórmula (2) o fórmula (3) con una azida. En realizaciones preferidas, la sustitución de  $OR^2$  comprende una reacción de Mitsunobu. En algunas de tales realizaciones, una fosforilazida proporciona la azida para la reacción de Mitsunobu.

30 Se desvela un método mejorado para preparar una 2-azido-2-desoxi-D-manopiranososa en el presente documento, método que comprende:

35 formar un triflato en la posición 2 de un derivado de 1,3,4,6-tetra-O-acil glucopiranososa; y desplazar el triflato con un nucleófilo de azida.

40 Pueden usarse otros métodos para preparar tales compuestos, y el presente método mejorado proporciona precauciones para minimizar la exposición a la humedad durante el procesamiento y aislamiento del producto. Esto produjo rendimientos enormemente mejorados con respecto a métodos conocidos, por ejemplo, Popelova y col., Carbohydrate Res. (2005) 340:161-166. En un método preferido, el derivado de 1,3,4,6-tetra-O-acil glucopiranososa es 1,3,4,6-tetra-O-acetilglucopiranososa, y el producto es 2-azido-1,3,4,6-tetra-O-acilmanopiranososa.

45 En otros aspectos, la invención proporciona una composición inmunogénica que puede provocar anticuerpos protectores contra *Meningitidis A*, que comprende un oligosacárido que tiene al menos dos unidades de sacárido, que normalmente son unidades de manosa, covalentemente unidas entre sí mediante un enlace que contiene fosfonato estabilizado que conecta C-6 de la primera unidad con C-1 de la segunda unidad en el que la primera manosa comprende un resto de espaciador en la configuración alfa en C-1 que puede conjugarse con una proteína. En muchas de tales realizaciones, al menos una unidad de sacárido, que puede ser una unidad de manosa, comprende un resto de espaciador ligado en alfa en su centro anomérico. En muchas de las realizaciones, el oligosacárido está conjugado con una proteína. Pueden usarse muchas proteínas tales como aquellas descritas anteriormente como proteínas transportadoras adecuadas, pero en realizaciones preferidas la proteína no es albúmina. En algunas realizaciones, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden al menos 2 restos de oligosacárido diferentes. En muchas realizaciones, el enlace fosfonato se forma por una reacción de Mitsunobu, y en ciertas realizaciones, el oligosacárido de cualquiera de las anteriores composiciones comprende al menos una unidad de manosa que comprende un resto de espaciador ligado en alfa en su centro anomérico.

55 En algunas de las composiciones inmunogénicas de la invención, la composición comprende al menos dos oligosacáridos diferentes que son específicos para al menos dos inmunotipos meningocócicos. Las composiciones también pueden incluir otros compuestos antigénicos, y en algunas realizaciones, las composiciones comprenden además un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*. Este antígeno es un polisacárido en algunas realizaciones, y en muchas de estas realizaciones el polisacárido está conjugado con una proteína.

60 En algunas realizaciones, las composiciones de la invención también comprenden al menos un antígeno derivado de *Meningitidis* de serotipos A, B, C, W135 o Y. En algunas realizaciones preferidas, este antígeno se deriva del serotipo C, W135 o Y de *Meningitidis*. Las composiciones de la invención comprenden frecuentemente además un adyuvante, y en algunas de las realizaciones el adyuvante es alumbre.

65 En muchas composiciones de la invención, el componente de oligosacárido está conjugado con una proteína

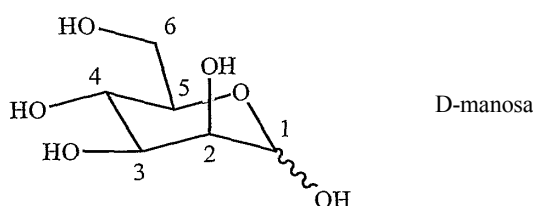
mediante un reactivo bifuncional que comprende un ácido dicarboxílico o un derivado del mismo. En muchas realizaciones, este ácido dicarboxílico comprende ácido adípico o ácido subérico o un derivado de los mismos. En otras realizaciones, el reactivo bifuncional comprende un escuarato.

5 La preparación de compuestos ligados con fosfonato dentro del alcance de la invención puede llevarse a cabo preparando un monómero aceptor y un monómero de alargamiento, cada uno de los cuales es un anillo de manopiranososa apropiadamente modificado, denominado una unidad de manosa.

10 El monómero de alargamiento está unido al aceptor mediante un enlace fosfonato para hacer un disacárido. El monómero de alargamiento puede adaptarse para permitir que su hidroxilo C6 se desproteja selectivamente; así, si se desea un oligosacárido más largo, el monómero de alargamiento en el sacárido dimérico puede convertirse en un aceptor. Puede desprotegerse sin desproteger los hidroxilos C3 y C4, de manera que el hidroxilo C6 puede ligarse al fosfonato de otro monómero de alargamiento. Este proceso pueden repetirse tantas veces como sea necesario para proporcionar un oligosacárido de la longitud deseada.

15 La Figura 3 representa cómo un monómero aceptor y un monómero de alargamiento se ligan para formar un oligosacárido que tiene dos unidades de manosa (es decir, un disacárido), y cómo este disacárido puede alargarse adicionalmente por desprotección del hidroxilo C6 seguido de unión de otro monómero de alargamiento. Opcionalmente, el monómero aceptor puede unirse a un soporte sólido por un conector escindible para facilitar la manipulación y aislamiento. En ese caso, el oligosacárido puede seguir unido al soporte sólido mediante múltiples iteraciones del proceso de alargamiento, y puede con el tiempo escindirse para liberar un producto de oligosacárido relativamente puro de la longitud deseada. El resto de espaciador Z se usa algunas veces para ligar el oligosacárido al soporte sólido durante la síntesis, y entonces se usa, opcionalmente con modificación, para conjugar el oligosacárido con una proteína.

25 La invención proporciona métodos para preparar oligosacáridos inmunogénicos que contienen dos o más unidades de manosa sustituidas con aza, conectadas mediante un enlace 1,6, que comprenden un fosfonato, en el que el primer resto comprende un resto de espaciador, resto de espaciador que está ligado a C-1 de una unidad de manosa en la configuración alfa, además de moléculas de oligosacárido o polisacárido más largas, y métodos para preparar los oligo- y/o polisacáridos en materiales más inmunogénicos conjugándolos con una proteína. Las unidades de manosa son anillos de piranososa que tienen la estructura básica de un anillo de manosa, pero que tienen al menos algunas modificaciones estructurales. En muchas realizaciones, la invención incluye al menos un sustituyente en el que un átomo de nitrógeno u otro heteroátomo está unido a un carbono del anillo en lugar de uno de los grupos hidroxilo de manosa; como se usa en el presente documento, tales anillos sustituidos se consideran unidades de manosa en tanto que la matriz de sustituyentes sobre el anillo de piranososa tenga la misma estereoquímica relativa que la matriz de estereocentros sobre la manosa. Obsérvese que la configuración de manosa no define la estereoquímica en C-1; C-1, que es el centro anomérico en una unidad de manosa, puede estar en tanto la configuración alfa como beta. Así, una unidad de manosa puede tener un átomo de C, N o S unido en lugar de uno de los hidroxilos de manosa, o puede tener dos o más de tales modificaciones. La estructura y numeración de átomos de carbono para D-manosa se proporciona aquí para referencia.



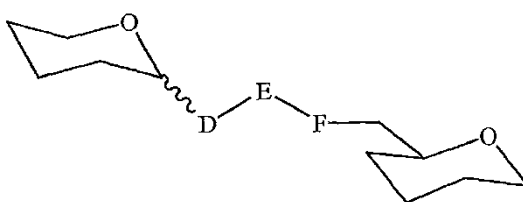
50 Los métodos de la invención pueden usarse con unidades de manosa que tienen la estereoquímica absoluta de tanto D-manosa como L-manosa; en muchas realizaciones, la estereoquímica absoluta es la de D-manosa. Sin embargo, un oligosacárido de la invención puede incluir una o más unidades de manosa que tienen la configuración de L-manosa. Puede, por tanto, por supuesto, ligarse un sacárido adicional o restos de péptido, por ejemplo, en tanto que incluya al menos dos unidades de manosa ligadas como se describe en el presente documento.

55 Los oligosacáridos de la invención incluyen al menos dos anillos de piranososa ligados juntos; si solo dos anillos están incluidos, la molécula puede describirse como un dímero; con tres ligados en secuencia puede describirse como un trímero; etc. Sin embargo, el término genérico oligosacárido como se usa en el presente documento incluye estas realizaciones más pequeñas, además de versiones de polímero más largas que tienen tres o más, cinco o más, siete o más, diez o más, quince o más, veinte o más, y más de 25 monómeros en la secuencia. Versiones que tienen más de aproximadamente cinco anillos de sacárido se denominan algunas veces en el presente documento polisacáridos. En muchas realizaciones, el oligosacárido comprende al menos tres unidades de manosa.

65 Independientemente del número de unidades de manosa incluidas, algunas veces es deseable ligar el oligosacárido a otras características moleculares, de manera que las unidades de manosa puedan sustituirse con diversos grupos, y el oligosacárido pueda ligarse mediante una o más unidades de manosa, normalmente mediante una de las

unidades de manosa terminales, a otro resto. En algunas realizaciones, es beneficioso ligar el oligosacárido a una proteína, y estas formas de glucoconjugado están específicamente incluidas dentro la invención. Normalmente, el glucoconjugado se forma por conjugación de la proteína de interés con un grupo funcional sobre el resto de espaciador unido en C-1 de la primera manosa en el oligosacárido, y el resto de espaciador está en la configuración alfa. En muchas realizaciones, se desea unir un grupo protector u otra funcionalidad a uno o más de los sustituyentes de heteroátomo sobre la unidad de manosa. En algunas realizaciones preferidas, los sustituyentes de heteroátomo están seleccionados de OH, OAc, NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NHAc, y un O, N, o S que está conectado a un grupo protector o a una proteína.

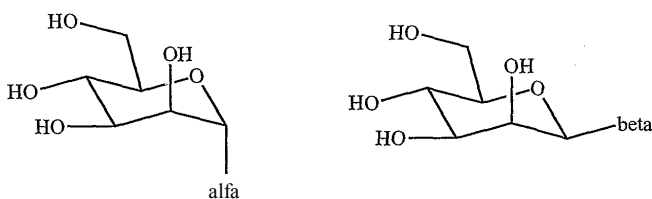
Las unidades de manosa normalmente están conectadas por un enlace 1,6. El enlace 1,6 significa que el carbono C-1, el centro anomérico, de la segunda unidad de manosa está conectado, tanto directa como indirectamente, con el carbono C-6 de la primera unidad de manosa por un enlace que incluye anillos de sacárido no intermedios. Normalmente, el enlace entre dos unidades de manosa incluirá al menos dos átomos, generalmente dos o más átomos de no carbono, entre los átomos de carbono de la unidad de manosa. En muchas realizaciones, el enlace es de la forma general:



en la que cada uno de D, E y F representa un heteroátomo seleccionado de O, N, S, Si y P, y cada uno de los anillos de tetrahidropirano representa el anillo de una unidad de manosa. En algunas realizaciones, E representa un átomo de fósforo, que está frecuentemente en el estado de oxidación de un fosfato o un fosfonato. Normalmente, al menos uno de D y F en esta fórmula es oxígeno (O), y en algunas realizaciones tanto D como F son oxígeno. Realizaciones particulares incluyen aquellas en las que D-E-F representa O-P(O)-O o C-P(O)-O o O-P(O)-C. Algunas veces, D-E-F es preferentemente un enlace que comprende -CH<sub>2</sub>-P(O)-O-.

En algunas realizaciones, el enlace entre unidades de manosa adyacentes es un enlace 1,6-alfa (1,6- $\alpha$ ). Para unidades de manosa, el enlace 1,6-alfa significa que el sustituyente de no H en C-1, que se corresponde con el carbono del centro anomérico de manosa, está en una relación estereoquímica relativa 'anti' con el sustituyente no de H en C-2. Alternativamente, una o más unidades de manosa en un oligosacárido pueden estar ligadas mediante un enlace beta (la configuración que tiene el enlace en el centro anomérico 'sin' con respecto al sustituyente de C-2 en una manosa se denomina un enlace beta). Sin embargo, normalmente los compuestos están ligados juntos en una relación alfa, independientemente de la naturaleza del propio enlace.

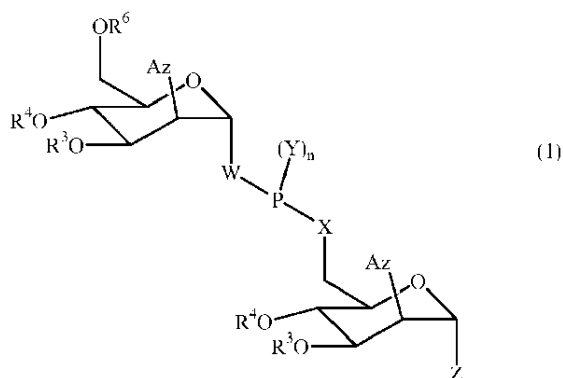
Las siguientes estructuras ilustran la diferencia entre las orientaciones de enlace alfa y beta.



Muchas realizaciones de la invención incluyen una unidad de manosa sustituida con aza, que significa que al menos uno de los hidroxilos de la manosa se ha sustituido con un sustituyente denominado en el presente documento el sustituyente "aza". Éste es un sustituyente en el que al menos el átomo ligado directamente a la unidad de manosa es nitrógeno. Sustituyentes aza incluyen NH<sub>2</sub> y diversas aminas sustituidas, que incluyen aminas alquiladas y dialquiladas, y aminas aciladas y diaciladas, en las que los grupos acilo incluyen heteroacilos tales como benciloxicarbonilo y metoxicarbonilo, además de grupos acilo tales como acetilo, formilo y benzoilo. Otras realizaciones del sustituyente aza incluyen NO<sub>2</sub> y N<sub>3</sub>. Algunas realizaciones de las unidades de manosa sustituidas con aza de la invención tienen el sustituyente aza en C-2 del anillo de manosa, y realizaciones preferidas incluyen compuestos y métodos en los que el sustituyente aza sobre una unidad de manosa es NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub> o NHAc.

Así, en algunas realizaciones, los compuestos y métodos de la invención comprenden un resto de fórmula (1):

65



en la que cada Az representa un sustituyente aza;  
 cada  $R^3$  y  $R^4$  representa independientemente H o un grupo protector;  
 $R^6$  representa H, un grupo protector, o un conector unido a otra unidad de sacárido;  
 uno de W y X es O, y el otro de W y X es  $CH_2$ ;  
 n es 2;  
 Y es =O y el otro Y es OR,  
 en el que R es H, alquilo C1-C6, o arilo C6-C12, o aril C6-C12-alquilo, o R es M, en la que M es un catión; y  
 Z es  $OR'$ ,  $SR'$ ,  $NR'_2$ , o halógeno, en las que cada  $R'$  es independientemente H o un grupo alquilo, acilo, arilo,  
 arilalquilo, heteroalquilo, heteroacilo, heteroarilo o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido;  
 o Z representa un conector unido a otra unidad de sacárido o un resto de espaciador conjugado con una  
 proteína.

Sustituyentes aza preferidos son aquellos en los que un átomo de nitrógeno está directamente unido a la unidad de  
 manosa. Ejemplos de tales sustituyentes incluyen  $N_3$ ,  $NH_2$ ,  $NH$ -alquilo,  $NH$ -acilo,  $NH$ -arilo y similares. Cada N en  
 estos sustituyentes puede incluir opcionalmente uno o dos grupos seleccionados de alquilo, arilo y acilo, en los que  
 cada alquilo, acilo y arilo está opcionalmente sustituido.

El término "protegido" o un "grupo protector" con respecto a grupos hidroxilo, grupos amina y grupos sulfhidrido se  
 refiere a formas de estas funcionalidades que se protegen de la reacción no deseable con un grupo protector  
 conocido para aquellos expertos en la materia tal como aquellos expuestos en Protective Groups in Organic  
 Synthesis, que puede añadirse o eliminarse usando los procedimientos expuestos en el presente documento.  
 Ejemplos de grupos hidroxilo protegidos incluyen, pero no se limitan a, éteres de sililo, tales como TBDMS o TBS,  
 tales como aquellos obtenidos haciendo reaccionar un grupo hidroxilo con un reactivo tal como, pero no se limita a,  
 t-butildimetil-clorosilano, trimetilclorosilano, triisopropilclorosilano y trietilclorosilano; éteres metílicos y etílicos  
 sustituidos tales como, pero no se limitan a, éter metoximetílico, éter metiltiometílico, éter benciloximetílico, éter t-  
 butoximetílico, éter 2-metoxietoximetílico, éteres tetrahidropiranílicos, éter 1-etoxietílico, éter alílico y éter bencílico;  
 ésteres tales como, pero no se limitan a, benzoilo, benzoilformiato, formiato, acetato, tricloroacetato y trifluoroacetato.  
 Ejemplos de grupos amina protegidos incluyen, pero no se limitan a, bencilo o dibencilo, amidas tales como  
 formamida, acetamida, trifluoroacetamida y benzamida; imidas, tales como ftalimida, y ditiosuccinimida; y otros. En  
 algunas realizaciones, un grupo protector para alcoholes es un grupo bencilo o un grupo acetilo, y un grupo protector  
 típico para una amina en el presente documento es carbamato de acetilo o de bencilo o de t-butilo.

"Grupo protector", como se usa en el presente documento, incluye aquellos restos reconocidos en la materia como  
 grupos protectores para los heteroátomos N, O y S, y se describen, por ejemplo, en el libro de referencia por  
 Greene, T. W., y Wuts, P. G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª ed., Wiley and Sons (1991). Acetilo (Ac)  
 es un grupo protector tal, y debido a que el PSC natural de *N. meningitidis* está frecuentemente acetilado,  
 particularmente en C-3, en algunas realizaciones de la invención, uno o más de los grupos protectores es Ac; y en  
 algunas realizaciones preferidas,  $R^3$  sobre al menos una de las unidades de manosa representa Ac.

En algunos de estos compuestos, uno de X y W es  $CH_2$ , mientras que el otro es O; por ejemplo, en algunas  
 realizaciones X y W son ambos O, y en otras, W es  $CH_2$  y X es O. Dentro de un compuesto dado de la invención que  
 es oligomérico y contiene tres o más unidades de manosa, pueden estar presentes diferentes realizaciones del  
 enlace; así, dos unidades de manosa ligadas juntas por un enlace que comprende un fosfonato pueden ligarse a una  
 tercera unidad de manosa mediante un enlace diéster de fosfato sin apartarse de la invención.

Es frecuentemente deseable conjugar los oligosacáridos de la invención con otra molécula, normalmente una  
 proteína. Los conjugados preparados por tales métodos están dentro del alcance de la invención. Así, la conjugación  
 de un sacárido con una proteína se realiza frecuentemente añadiendo una molécula bifuncional reactiva a  
 la proteína, luego exponiendo la proteína derivatizada al sacárido, de manera que el sacárido se ligue covalentemente  
 mediante el conector proporcionado por el reactivo bifuncional, que frecuentemente está unido a uno de los grupos

hidroxilo del sacárido. Sin embargo, en la síntesis controlada de compuestos de la invención, es especialmente conveniente incluir un resto de espaciador específicamente diseñado para conjugar el oligosacárido con una proteína. Un resto de espaciador tal puede unirse a una cualquiera de las unidades de manosa en un oligosacárido; sin embargo, normalmente está sobre una unidad de manosa terminal, tanto el primer monómero 'ceptor', como el último monómero de 'alargamiento'. Frecuentemente, está en C-1 del aceptor o C-6 del monómero de alargamiento, y en compuestos de fórmula (1) puede ser el grupo representado por Z o el representado por R<sup>6</sup>.

El resto de espaciador para conjugar el oligosacárido con una proteína puede comprender un resto de espaciador de múltiples átomos para hacer el epítipo inmunogénico del oligosacárido más disponible y así más eficaz. Alternativamente, por ejemplo, Z en un compuesto tal como aquellos representados por la fórmula (1) puede ser un único átomo tal como O o N o S, y puede proporcionarse un espacio entre el oligosacárido y la proteína por un reactivo bifuncional usado para ligar el oligosacárido y una proteína transportadora juntos. Reactivos bifuncionales adecuados para su uso en los glucoconjugados de la invención incluyen aquellos conocidos en la técnica. Ejemplos de tales incluyen ácidos dicarboxílicos tales como ácidos malónico, succínico, adípico y subérico, o versiones activadas de los mismos, y derivados de ácido escuárico. Estos tipos de reactivos son particularmente convenientes para ligar un compuesto en el que el resto de espaciador comprende una amina a una proteína.

En algunas realizaciones, el resto de espaciador tiene al menos dos o tres átomos de longitud, aunque opcionalmente puede ser un único átomo o puede ser mucho más largo; un ejemplo es un compuesto de fórmula (1), en la que Z representa un grupo 2-aminoetoxi. El grupo 2-aminoetoxi o un homólogo del mismo puede introducirse en el monómero aceptor antes de que se unan los monómeros de alargamiento, y se introduce opcionalmente en forma protegida de manera que no participe en las reacciones posteriores. El resto de espaciador debe incluir al menos un grupo funcional que pueda usarse para ligar el oligosacárido a una proteína, y normalmente incluye un heteroátomo, N, O o S, para este fin, aunque también se contemplan otros grupos tales como un dieno o un dienófilo para el enlace mediante una reacción de Diels-Alder, o un grupo carboxilato para conjugar la proteína con el oligosacárido mediante un éster o amida. En muchas realizaciones tales como el grupo 2-aminoetoxi tratado anteriormente, el resto de espaciador incluye un nitrógeno para este fin; el nitrógeno puede protegerse cuando se introduce y durante la construcción del oligosacárido, pero puede desprotegerse selectivamente después de que el oligosacárido se haya construido en condiciones que no destruyan el oligosacárido. La amina del resto de espaciador se acila o alquila entonces fácilmente, por ejemplo, con un reactivo bifuncional, cuyo otro extremo se une similarmente a una proteína. El orden de tal unión, es decir, qué trozo del glucoconjugado se une al reactivo bifuncional primero, no es importante y se determina por el criterio del profesional. Algunos ejemplos típicos, pero no limitantes, de grupos espaciadores incluyen -Het-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-A, -Het-Ph-A, -Het-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-A y formas sustituidas de los mismos, en las que cada Het representa un heteroátomo, normalmente O, S o N; cada Ph representa un grupo fenilo, opcionalmente sustituido; y cada n representa un número entero de 1-10; A representa un grupo funcional o un residuo del mismo que puede o liga el espaciador a la proteína, tal como un N, O, o S, o éster, una amida, u otro grupo que contiene carboxilo, un dieno o un dienófilo. Preferentemente, el espaciador comprende OR', SR' o NR'<sub>2</sub>, en las que cada R' es independientemente H o un grupo alquilo, acilo, arilo, arilalquilo, heteroalquilo, heteroacilo, heteroarilo o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido y puede comprender además A.

M en la fórmula (1) puede representar un catión de metal alcalino, seleccionado de Li, Na, K y Cs, o una sal de amonio NR<sub>4</sub><sup>+</sup>, en la que cada R es independientemente H o alquilo C1-C6 o heteroalquilo C1-C6. Alternativamente, puede representar cualquier otra especie catiónica farmacéuticamente aceptable tal como MgX o CaX, en las que X representa halógeno, hidroxilo, acetoxi, trifluoroacetoxi, bisulfato, bicarbonato, o cualquier otra especie adecuada. En algunas realizaciones, M es un catión divalente, y es compartido por dos moléculas de fórmula (1).

Los métodos de la invención proporcionan formas para sintetizar los compuestos de oligosacárido dentro de la invención. Los métodos incluyen, por ejemplo, formas para ligar dos unidades de manosa juntas de un modo deseado, tal como formando un enlace 1,6-alfa entre dos unidades de manosa. Si el enlace 1,6-alfa es un fosfato o fosfonato tal como los compuestos de fórmula (1) en la que X es O, el enlace puede crearse por una reacción de Mitsunobu. La reacción de Mitsunobu se describe, por ejemplo, en Campbell, D. A., J. Org. Chem. (1992) 57:6331-6335, e implica una activación de un alcohol con un reactivo tal como un azodicarboxilato, por ejemplo, DEAD o DIAD, y una fosfina (por ejemplo, trifenilfosfina o tris(p-clorofenil)fosfina), seguido de desplazamiento del O activado por una especie nucleófila. En el caso de compuestos de fórmula (1) en la que X es O, el nucleófilo es normalmente una especie P-O<sup>-</sup>, normalmente un anión fosfonato o fosfato. En otros aspectos de la presente invención, se emplea una reacción de Mitsunobu para introducir un sustituyente aza en un grupo sacárido, en cuyo caso las condiciones son similares, excepto que el nucleófilo es una azida, que puede suministrarse como un anión azida o como una trialkylsilylazida o una fosforilazida.

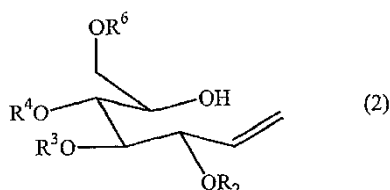
Los métodos desvelados en el presente documento también proporcionan formas para instalar y modificar sustituyentes de N (sustituyente aza) sobre las unidades de manosa de compuestos tales como aquellos de fórmula (1). Así, en algunos métodos, los métodos proporcionan formas para insertar un sustituyente aza en una unidad de manosa con la estereoquímica apropiada. Un método tal comprende desplazar un hidroxilo C-2 sobre un anillo de piranosa con un sustituyente de N, normalmente N<sub>3</sub>. Puede insertarse con una reacción de desplazamiento nucleófilo, pero en algunas realizaciones se inserta mediante una reacción tipo Mitsunobu con la ayuda de un grupo de activación tal como un azodicarboxilato, por ejemplo, DEAD o DIAD. El nucleófilo para esta reacción de

Mitsunobu puede proporcionarse por una fosforilazida tal como difenilfosforilazida. La mejora particular proporcionada por la presente invención en esta reacción comprende el uso de una fosforilazida como fuente de sustituyente aza, y la incorporación de condiciones de procesamiento sustancialmente libres de agua para evitar la descomposición del producto. En las condiciones descritas en el presente documento, el rendimiento del derivado de 2-azido de una unidad de manosa mejora sustancialmente con respecto a los métodos del estado de la técnica.

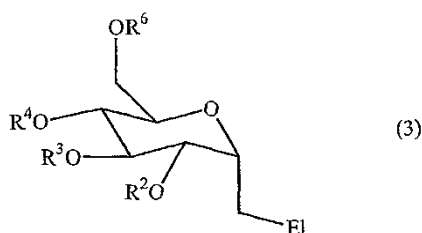
En algunas realizaciones preferidas, al menos una de las unidades de manosa de un oligosacárido de la invención es una azamansa sustituida con aza que tiene una amina o amina acilada, que está frecuentemente en C-2 de la unidad de manosa. En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el sustituyente aza se inserta como N<sub>3</sub>, que puede reducirse para proporcionar una amina, y la amina puede acilarse en condiciones tales como aquellas descritas en el libro de Greene y Wuts sobre grupos protectores citado anteriormente. La reducción de la azida (N<sub>3</sub>) a NH<sub>2</sub> se realiza fácilmente por métodos típicos tales como usando borohidruro de níquel, que puede generarse *in situ* a partir de cloruro de níquel hexahidratado y borohidruro de sodio como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, la invención proporciona oligosacáridos y métodos para preparar oligosacáridos, en los que el oligosacárido comprende una serie de repetición de unidades de manosa sustituidas con aza; en muchas realizaciones, cada una de las unidades de manosa tiene un sustituyente aza, normalmente N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> o NHAc, en C-2 de cada unidad de manosa, por ejemplo, en los compuestos de fórmula (1), Az sería N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> o NHAc. Opcionalmente, el enlace entre al menos dos de las unidades de manosa es un enlace fosfonato que puede ser un enlace 1,6-alfa tal como aquel en los compuestos en la fórmula (1), en la que W es CH<sub>2</sub> y X es O. Tales enlaces 1,6-alfa que comprenden un fosfato o un fosfonato, tales como los compuestos en la fórmula (1) en la que W es tanto CH<sub>2</sub> como O y X es O, pueden formarse por la reacción de Mitsunobu descrita anteriormente. Preferentemente, Mitsunobu se hace bajo condiciones modificadas que se describen por Campbell, como se ha citado anteriormente.

Un método mejorado para preparar ciertas moléculas de sacárido que son útiles para la síntesis de los oligosacáridos descritos anteriormente se desvela en el presente documento. Así, se desvelan métodos para sintetizar ciertos monosacáridos sustituidos con fosfonato. Por ejemplo, un compuesto de fórmula (2), que está disponible de glucosa, puede convertirse en un precursor para un éster de fosfonato útil para formar el enlace 1,6-alfa que comprende el fosfonato mostrado en la fórmula (1) en la que W es CH<sub>2</sub> y X es O. El método incluye ciclar un compuesto de fórmula (2) con un electrófilo



para formar un compuesto de fórmula (3)



en la que cada de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>6</sup> es independientemente H o un grupo protector; y El representa el residuo de un electrófilo.

El electrófilo usado para efectuar el ciclado puede ser una sal de mercurio, en cuyo caso después del ciclado con el compuesto de fórmula (3), el residuo del electrófilo normalmente es -HgX, en la que X es halógeno, acetoxi o similares. El mercurio puede sustituirse mediante tratamiento con yodo, dando un compuesto de fórmula (3) en el que El es I. El yoduro puede entonces desplazarse con un nucleófilo de fósforo; por ejemplo, el tratamiento con fosfito de triálquilo directamente desplaza el yoduro y produce un fosfonato de dialquilo. También pueden usarse otros electrófilos para efectuar el ciclado; por ejemplo, se conocen halocicladados, y proporcionarían directamente un haluro como El, que podría desplazarse. Similarmente, pueden usarse métodos por lo que la olefina puede epoxidarse con la estereoquímica correcta de manera que la apertura del epóxido pueda producir el anillo de piranosa, y un compuesto de fórmula (3), en la que El es OH. El OH puede entonces convertirse en un haluro o un sulfonato desplazable tal como un triflato, tosilato o mesilato, y el fósforo puede introducirse como se ha descrito anteriormente con fosfito de trietilo, o puede introducirse por sustitución nucleófila directa usando una especie de P aniónica tal como el anión sodio del fosfito de dietilo.

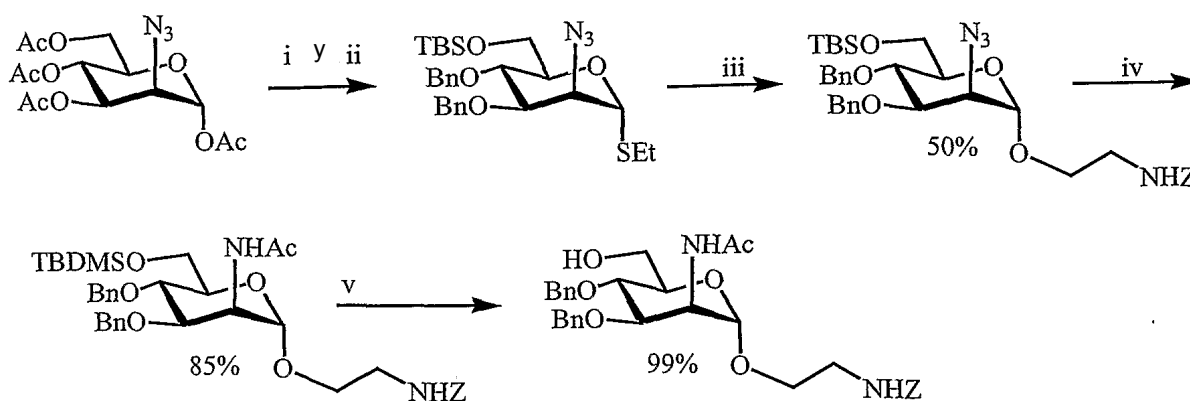
Esto proporciona un derivado de glucosa de fórmula (3) en vez de una unidad de manosa sustituida con N; así, la

invencción proporciona además métodos para convertir  $OR^2$  en la fórmula (2) o fórmula (3) en un sustituyente aza que tiene la orientación 'axial' deseada. Esta introducción de un sustituyente de nitrógeno se realiza frecuentemente haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (3) con un agente de activación para formar un compuesto en el que  $R^2$  es un grupo desplazable, tal como un triflato, tosilato o mesilato. Como tales desplazamientos en (2) producirían transposición alílica, esta conversión se hace frecuentemente sobre un compuesto de fórmula (3). Aunque es posible hacer esta reacción por desplazamientos nucleófilos habituales, en una realización de la invencción, esta sustitución de  $OR^2$  con un sustituyente aza se hace usando una reacción de Mitsunobu. En una realización preferida, la reacción de Mitsunobu emplea una fosforilazida como fuente del sustituyente aza. Así, la reacción proporciona una forma muy eficaz para convertir un compuesto derivado de glucosa fácilmente disponible tal como (2) en un derivado de manosa sustituido con 2-desoxi-2-aza, en el que el sustituyente 2-aza es una azida. La azida puede entonces reducirse a una amina tal como tratamiento con borohidruro de níquel; y la amina puede funcionalizarse o protegerse según se desee. En muchas realizaciones de la invencción, la amina se acila inmediatamente con un grupo protector, frecuentemente con acetilo (Ac), ya que el grupo acetilo puede servir de grupo protector y también aparece en la unidad de manosa del PSC de *N. meningitidis*.

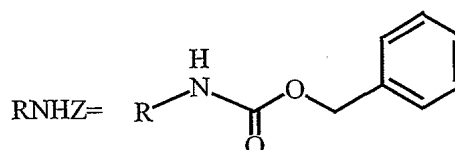
En el presente documento se desvela un método enormemente mejorado para preparar un derivado de manosa sustituido con 2-aza en forma protegida. El método comprende desplazar el grupo 2-hidroxilo de un anillo de glucopiranososa de otro modo protegido por conversión del 2-hidroxilo en un triflato seguido de desplazamiento del triflato con azida. El desplazamiento nucleófilo invierte el centro, convirtiendo así la glucopiranososa en una manopiranososa. Aunque se ha informado del propio desplazamiento, avanza con rendimiento aislado muy malo usando condiciones estándar. En la presente invencción, se ha encontrado que puede obtenerse un alto rendimiento del producto deseado usando la 1,3,4,6-tetra-O-acilglucopiranososa fácilmente disponible, en tanto que el procesamiento de la reacción se haga sustancialmente sin agua. Así, el triflato se desplaza por anión azida en un disolvente aprótico polar tal como DMF o NMP; entonces, en vez de usar un procesamiento extractivo acuoso / orgánico habitual para eliminar la mayoría del disolvente y sales, la mezcla de reacción puede concentrarse parcialmente antes de aplicarse directamente a una columna de cromatografía. Usando un procesamiento no acuoso tal, el producto puede eluirse de la columna con alto rendimiento.

La siguiente descripción proporciona más detalle sobre los métodos para preparar ciertos compuestos de la invencción.

Una realización de un aceptor de monómero de partida, el compuesto **XIV** mostrado a continuación, se describe en Berkin, A. y col., Chem. Eur. J. (2002) 8:4424-4433. Como alternativa, puede usarse la siguiente secuencia:



(i) TBDMSCl, pyr (ii) BnBr, NaH (iii) NIS, AgOTf,  $HO(CH_2)_2NHZ$   
 (iv) 1.  $NaBH_4$ ,  $NiCl_2(H_2O)_6$  2.  $Ac_2O$  (v) TBAF



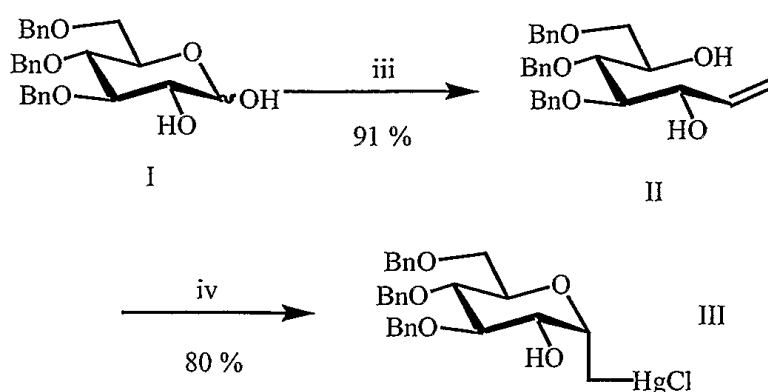
Cuando se usó el compuesto protegido con di-bencilo para introducir el espaciador en el centro anomérico, se obtuvo aproximadamente una mezcla 1:1 de anómeros. Si en su lugar los éteres bencílicos se sustituyen con ésteres de acetato, solo se obtienen trazas del anómero beta, y resulta el 86 % de rendimiento aislado del monómero alfa deseado. Así, el método proporciona una forma eficaz para producir la configuración alfa deseada en



este centro, que es frecuentemente el centro al que se une un espaciador que conecta el oligosacárido con una proteína transportadora. Se desea la configuración alfa debido a que hace coincidir mejor el esqueleto de all-alfa del PSC natural del organismo diana. También se encontró que el anómero beta era menos reactivo en la etapa de sustitución de etilto-glucósido. Sin embargo, los acetatos producen algunas veces dificultades después en la secuencia, de manera que en algunas realizaciones, los éteres bencilicos se utilizaron para esta etapa. El grupo azido del producto intermedio de 2-azamano completamente protegido se redujo de nuevo a una amina usando  $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  cat., y la amina se acetiló con anhídrido acético con un rendimiento del 85 % durante ambas etapas. Finalmente, se eliminó el éter silícico con TBAF para obtener el aceptor de elemento estructural de partida con un rendimiento del 99 %.

Una síntesis conveniente de los monómeros de alargamiento deseados se muestra en el Esquemas 1-3 a continuación, que permite preparar monómeros de alargamiento que tienen, por ejemplo, diferentes grupos protectores.

### Esquema 1

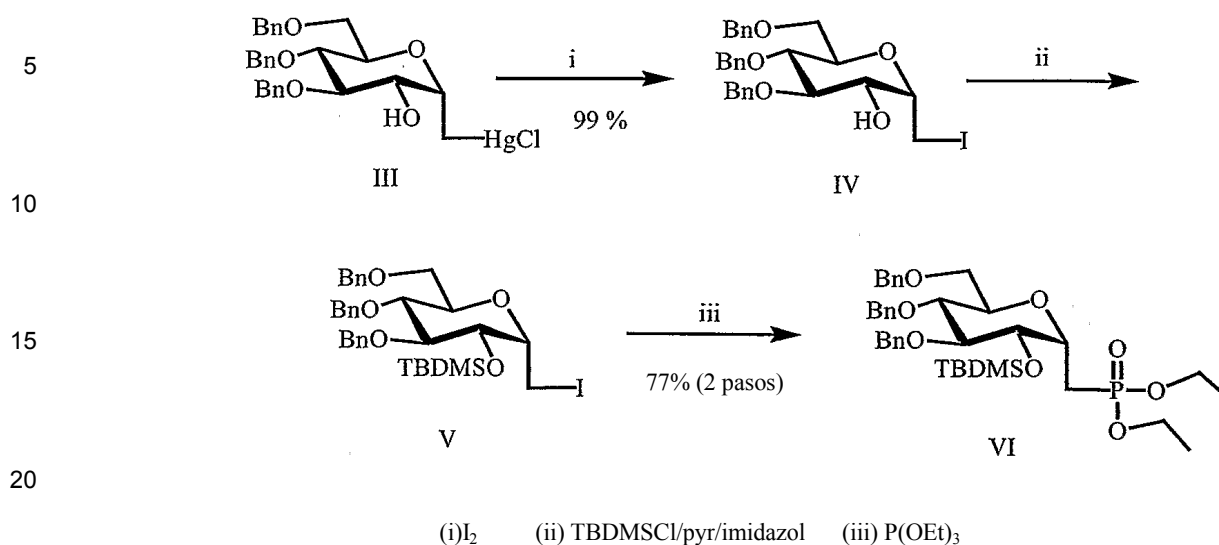


(i)  $\text{MeOH}/\text{collidina}$  (ii)  $\text{BnBr}/\text{KOH}$ ,  $\text{HOAc}$  (70%),  $\text{NaOMe}/\text{MeOH}$   
 $\text{BuLi}/\text{metilbromotrifenilfosfina}$  (iv)  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{KCl}$

(iii)

El Compuesto I se obtuvo y se usó como una mezcla de anómeros, y se obtuvo en siete etapas a partir de glucosa. Se alargó mediante una reacción de Wittig con metilbromotrifenilfosfina, por ejemplo, para proporcionar el alqueno con un rendimiento del 91 %. Otra preparación de este alqueno a partir de D-arabinosa usó un alargamiento de dos carbonos que implica la adición de divinilcinc. La ciclación con mercurio del compuesto II dio exclusivamente el alfa-C-glucósido, aunque el alqueno protegido con tetra-O-bencilo correspondiente da una mezcla de anómeros. Pueden usarse métodos alternativos para ciclar tales especies, tales como haloeterificación y epoxidación / apertura de anillo electrófila. El compuesto de acetato de mercurio se convirtió en el derivado de mercurio correspondiente, que se aisló. El cloruro de mercurio se sustituyó posteriormente con yodo con rendimiento excelente mediante tratamiento con  $\text{I}_2$ .

## Esquema 2



25 Para evitar la formación de un fosfato cíclico en la siguiente etapa, el grupo hidroxilo C2 se protegió primero como un éter silílico. El C-fosfonato VII se obtuvo por tratamiento del yoduro primario V con fosfito de trietilo dando VI con un rendimiento del 77 %. El éter silílico se escindió posteriormente del hidroxilo C2 usando fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) con un rendimiento del 99 %.

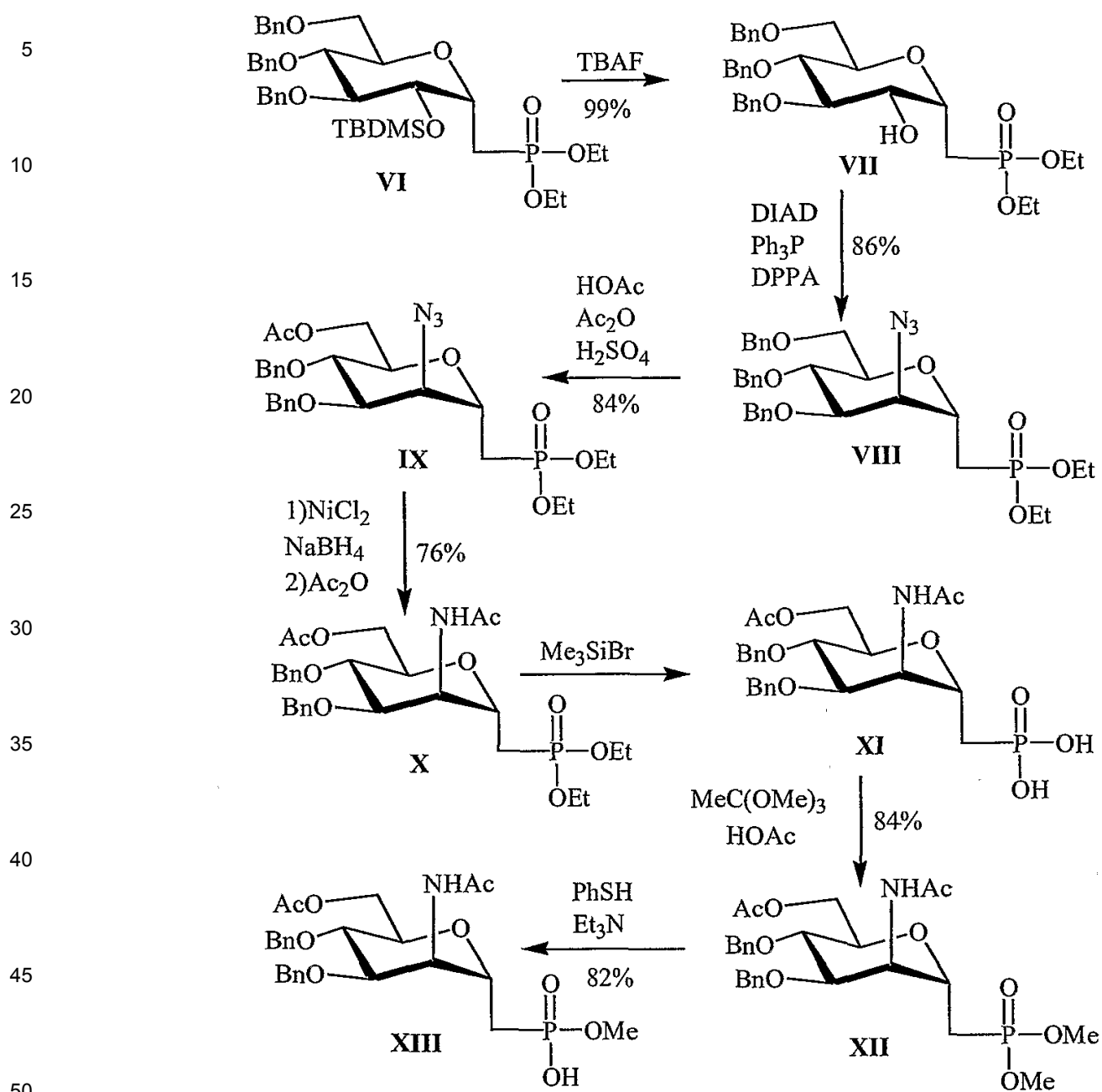
30 El grupo acetamido axial se introdujo por una reacción de desplazamiento con azida, seguido de reducción y acetilación como se muestra en el Esquema 3. El desplazamiento invierte el centro C-2, proporcionando la orientación axial del sustituyente de acetamida C-2 que se encuentra en el polisacárido capsular natural. Esta azida se introdujo con bajo rendimiento preparando un triflato del hidroxilo C-2 y desplazándolo con anión azida. Sin embargo, usando condiciones de Mitsunobu y difenilfosforilazida (DPPA) como fuente de azida, se obtuvo un alto rendimiento (86 %) del derivado de azido IX. Para introducir un grupo protector selectivamente eliminable en O-6, el éter bencílico primario de VIII se sustituyó con un éster de acetato con un rendimiento del 84 % usando condiciones de acetólisis estándar; esa etapa podría omitirse, en cuyo caso todos los ésteres bencílicos podrían escindir a la vez. El omitir la acetólisis acorta la síntesis, pero hace más difícil el uso del hidroxilo C-6 para el alargamiento adicional u otra funcionalización, aunque el intercambio del bencilo con un acetilo también puede hacerse después de una etapa de alargamiento. La reacción de acetólisis funcionó mejor cuando se usó una mezcla de anhídrido acético y ácido acético (1/1) junto con ácido sulfúrico. La azida se redujo con borohidruro de sodio en presencia de cloruro de níquel hexahidratado, y la amina resultante se acetiló con anhídrido acético dando el compuesto X con un rendimiento del 69 %.

45 El Esquema 3 ilustra la completitud de un monómero de alargamiento dentro de la invención que es una unidad de 2-azamano. Para la construcción del monómero de C-fosfonato de alargamiento se usó una versión modificada de un enfoque publicado. Véase Casero, F. y col., J. Org. Chem. (1996) 61:3428-3432. Después de la desililación del precursor VI para proporcionar el compuesto de 2-OH VII, el desplazamiento de azida usando condiciones de Mitsunobu dio el 2-azido-2-desoxi-manopiranosido VIII (86 %). Se introdujo un grupo protector ortogonal, para permitir después el alargamiento de 6-O, por acetólisis proporcionando el 6-O-acetato IX (84 %). La reducción de azida seguida de la acetilación dio X (76 %), del que se eliminaron los ésteres etílicos dando el monómero de alargamiento XI con un ácido fosfónico libre. Para muchas realizaciones, se prefiere acoplar un monoéster del ácido fosfónico, de manera que el producto siga protegido como un éster de fosfonato. Estos compuestos pueden prepararse en dos etapas como se muestra a continuación para la conversión de XI en XIII. Obsérvese que la reducción de azida puede posponerse hasta que se hayan instalado unidades de manosa adicionales si se desean oligosacáridos más largos, de manera que todas las azidas puedan reducirse y las aminas resultantes se acetilen simultáneamente.

60

65

Esquema 3

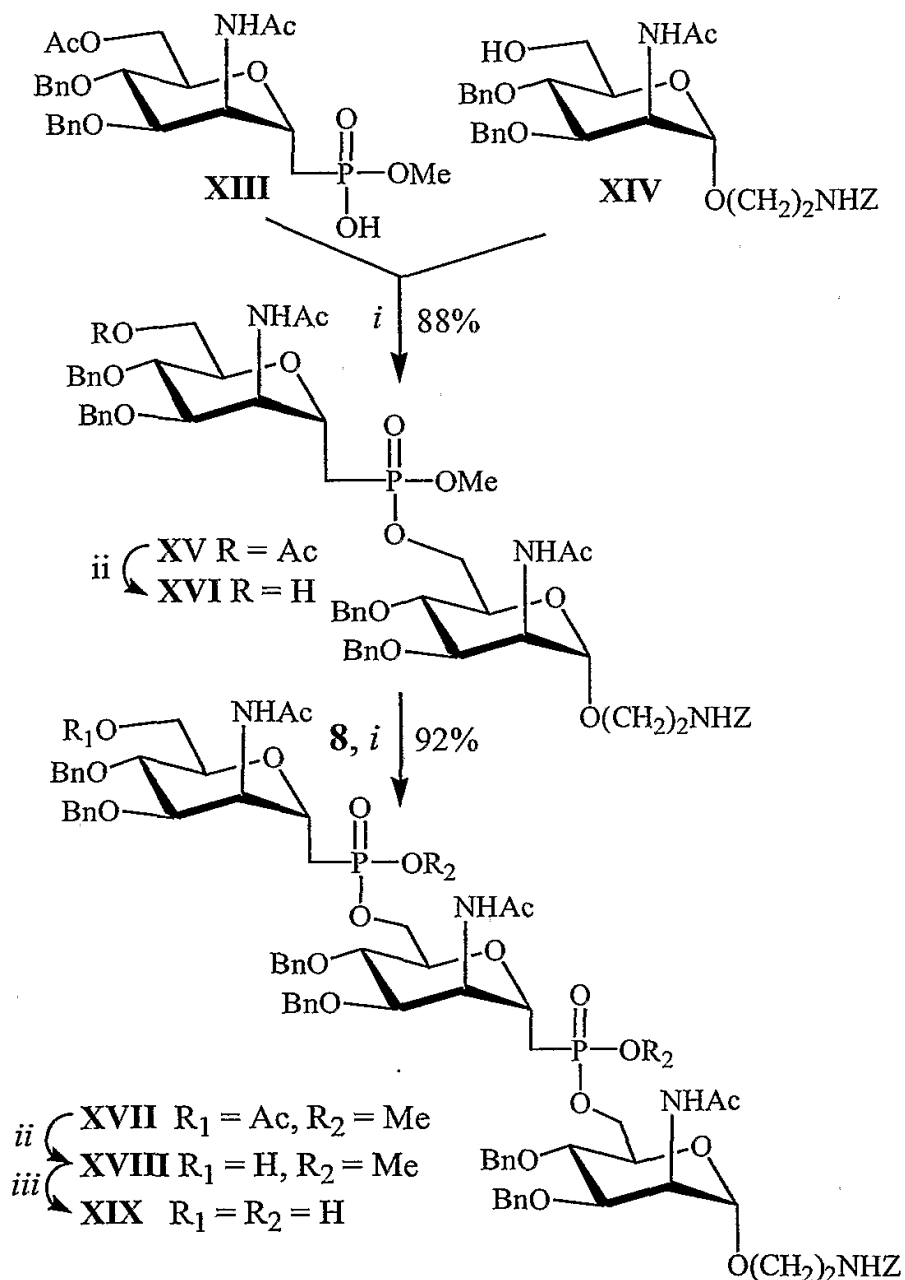


Los grupos protectores de etilo sobre el derivado de ácido fosfónico se sustituyeron con metilos como se muestra en el Esquema 3 anterior para facilitar la eliminación después de construirse un oligosacárido. Una vez se ha formado el disacárido ligado, el enlace es relativamente lábil en las condiciones necesarias para escindir los fosfonatos de etilo. Así, los grupos etilo se eliminaron cuantitativamente mediante tratamiento con bromotrimetilsilano (TMSBr), y el producto de ácido fosfónico se convirtió en su fosfonato de dimetilo correspondiente con un rendimiento del 84 % usando ácido acético y ortoacetato de trimetilo. Esta reacción tubo que monitorizarse cuidadosamente, ya que la desacetilación es una reacción secundaria competitiva durante tiempos de reacción prolongados. El tratamiento del fosfonato de dimetilo con trietilamina (TEA) y fenilmercaptano dio eficazmente el fosfonato de monometilo **XIII** con un rendimiento del 82 %.

El Esquema 4 ilustra la reacción de acoplamiento para establecer un enlace fosfonato entre dos unidades de manosa. Se ha informado de tanto condiciones de DCC como de Mitsunobu para acoplar un fosfonato con un alcohol como el monómero de aceptor, con un rendimiento en el intervalo del 50-70 %. Pozsgay y col. (véase, A. Berkin, B. Coxon y V. Pozsgay, Chem. Eur. J., 2002, 8, 4424.) Sin embargo, cuando el aceptor ya contuvo un fosfonato, los rendimientos disminuyeron bruscamente, que podría limitar la capacidad de tales condiciones para

proporcionar los trímeros deseados, tetrámeros, y otros polisacáridos más largos. Las condiciones de Mitsunobu en el presente caso, usando  $\text{Ph}_3\text{P}$  y DIAD, dieron un buen rendimiento (47 %) de **XV**. Sin embargo, se realizaron rendimientos sustancialmente mejores usando una versión modificada de las condiciones de Mitsunobu, como se describe en Campbell, J. Org. Chem. (1992) 57:6331-6335. Las condiciones de Campbell, usando tris(4-clorofenil)fosfina y un gran exceso de trietilamina, proporcionaron **XV** con un rendimiento del 88 %. Se obtienen los mejores rendimientos en esta reacción cuando se tiene cuidado en excluir otras especies nucleófilas que podrían competir con el anión fosfonato débilmente nucleófilo.

## Esquema 4

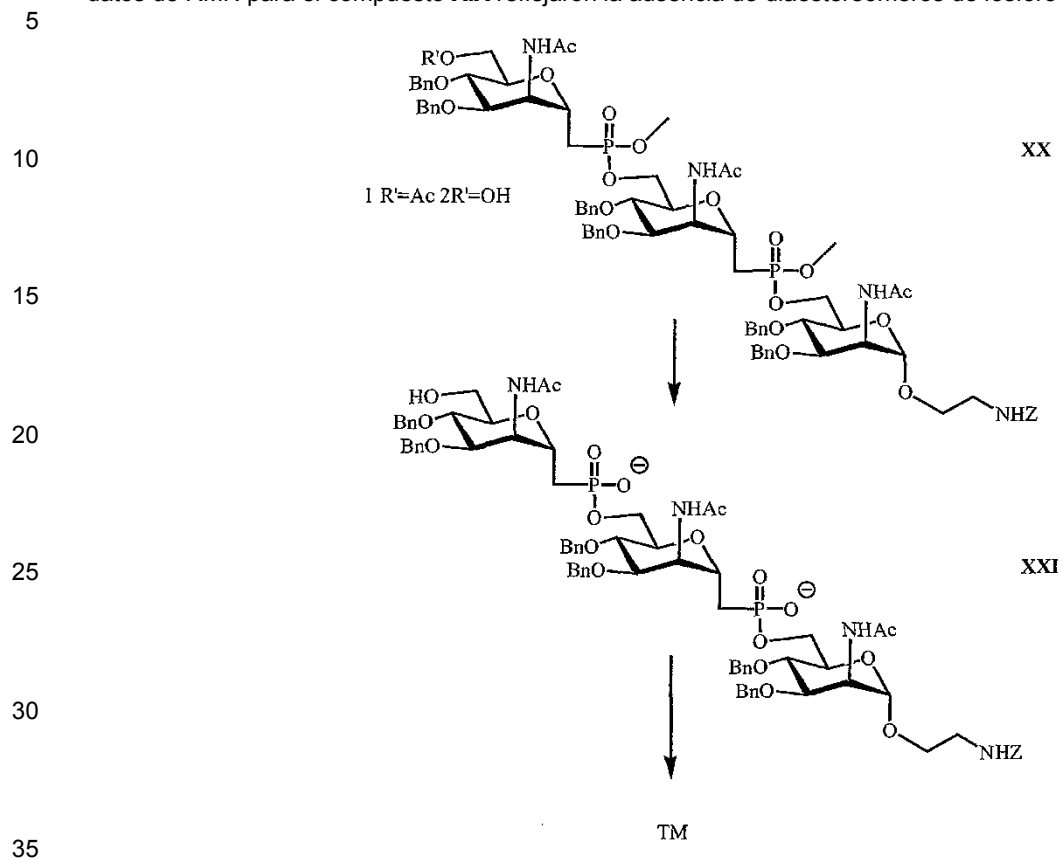


Clave: *i*)  $(p\text{ClPh})_3\text{P}$ , DIAD,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF;

*ii*) KOH, MeOH; *iii*) PhSH, DBU,  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

Usando las condiciones de Mitsunobu descritas anteriormente, se encontró que el rendimiento en la formación del trímero era comparable e incluso superior a en la formación del dímero. El dímero **XV** se transformó en un nuevo aceptor ( $\rightarrow$ **XVI**) por desacetilación. La reacción de Mitsunobu modificada entre **XVI** y **XIII** proporcionó entonces el trímero **XVII** con un rendimiento del 92 %. La identidad de los productos se demostró por EM y RMN, la última

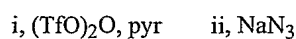
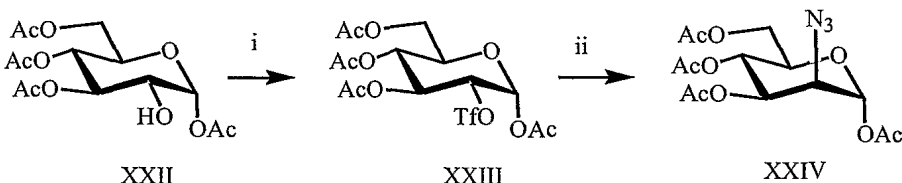
parcialmente compleja debido a diaestereómeros fosfonato que resultan de la quiralidad del fósforo. El compuesto **XVII** se desacetiló, que crea un nuevo aceptor **XVIII** que puede unirse a otro monómero de alargamiento. Después de ésta y la eliminación posterior del éster metílico de fosfonato, se destruyó la quiralidad del centro de fósforo, y los datos de RMN para el compuesto **XIX** reflejaron la ausencia de diaestereómeros de fósforo.



También se encontró que prolongando la exposición de la mezcla del aceptor **XIV** y el monómero de alargamiento **XIII** a las condiciones de Mitsunobu, y en presencia de algún exceso de **XIII**, la reacción proporciona monómeros más largos. Así, bajo las condiciones de reacción, la escisión del grupo acetilo C-6 de un monómero de alargamiento incorporado se produce *in situ* a alguna velocidad; y esto proporciona una nueva molécula aceptora. Así, a cierto grado, por ejemplo, se produce la conversión de **XVI** en **XVI** por exposición prolongada a la reacción de Mitsunobu, y bajo aquellas condiciones en presencia de exceso de **XIII**, se forma **XVII**; etc., para producir oligómeros mayores. Así, esta reacción proporciona una forma para hacer oligómeros que contienen múltiples unidades de manosa en forma protegida sin requerir un proceso escalonado de desprotección / aislamiento, y permite la síntesis de oligosacáridos inmunogénicos de la invención que tienen una distribución de tamaños. En algunas realizaciones, se ha mostrado que esto proporciona principalmente oligosacáridos de tetra- y penta-manosa, con cantidades menores de oligómeros más largos. Así, proporciona una forma altamente eficaz para sintetizar compuestos oligoméricos más largos dentro de la invención.

La invención también proporciona una síntesis simple y mejorada de 2-azido-2-desoxi-D-manopiranosas a partir de un precursor fácilmente disponible, 1,3,4,6-tetra-O-acetil-glucopiranosas, como se ilustra en el Esquema 5. Este producto intermedio es útil para la síntesis de muchas de las unidades de manosa de la presente invención.

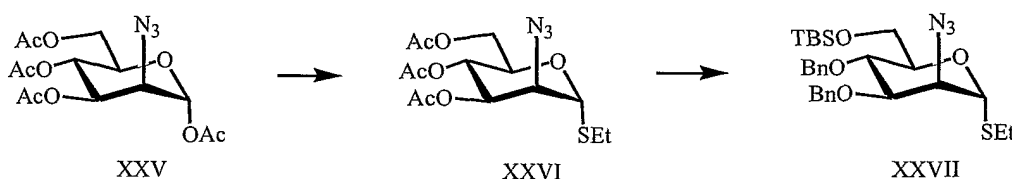
**Esquema 5**



En un intento por sintetizar un compuesto de 2-azidomanosa protegido, se convirtió 1,3,4,6-tetra-O-acetilglucopiranososa en su 2-O-triflato usando anhídrido trifílico, y el triflato se trató con NaN<sub>3</sub>. Según CCF y MALDI-TOF-EM, el producto de 2-azido se forma con un alto rendimiento, pero aparentemente se descompone sustancialmente durante un procesamiento acuoso típico, y el rendimiento aislado fue solo del 20 %. Sin embargo, cuando la reacción se procesó sin usar agua, el rendimiento mejoró bruscamente. Así, la mayoría de la DMF usada como disolvente para el desplazamiento se eliminó a presión reducida, y el residuo se transfirió a una columna secada que contenía una suspensión de sílice previamente secada en tolueno seco. El producto se eluyó usando un gradiente de acetato de etilo creciente en tolueno. Una vez purificado, el producto fue relativamente estable. El material de partida de 1,3,4,6-tetra-O-acetilglucopiranososa es muy fácil de sintetizar a gran escala en una síntesis de una etapa a partir de glucosa, y se obtuvo el triflato intermedio usando condiciones estándar con un rendimiento del 97 %. El rendimiento aislado de la inversión como se ha mencionado depende mucho de cuánta agua libre se procese: es necesaria la exclusión de agua usando material de vidrio previamente secado y sílice previamente secada como se ha descrito anteriormente para el rendimiento óptimo. Minimizando la exposición a la humedad durante el procesamiento y durante la cromatografía en gel de sílice, se obtuvieron rendimientos reproducibles del 60 % o mejores.

El producto de tetraacetato muestra alguna tendencia a descomponerse durante el almacenamiento. Sin embargo, una vez convertido en 1-etiltioglucofósido mediante tratamiento con EtSH/BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O fue bastante estable. A continuación se trató con alcóxido para eliminar los grupos acetato, como se muestra en el Esquema 6, y el hidroxilo primario se protegió selectivamente con un grupo t-butildimetilsililo (TBS). Los dos hidroxilos secundarios se protegieron como ésteres bencílicos, pero aquí puede usarse una variedad de grupos protectores diferentes y en muchas otras etapas durante todo este proceso. Entonces, el grupo -SEt se sustituyó con un conector, que puede usarse para conjugar el oligosacárido final con una proteína. Alternativamente, podría usarse para unir el monómero aceptor a un soporte sólido mientras que se ensambla el oligosacárido. En este caso, se introdujo un grupo aminoetilo protegido en la posición anomérica; sin embargo, puede usarse una amplia variedad de grupos de enlace que son adecuados para conjugar el oligosacárido, y aquellos expertos en la materia pueden seleccionar y usar fácilmente otros.

Esquema 6



El dímero puede usarse como inmunogén sin alargamiento adicional, o pueden prepararse y usarse oligómeros más largos. Para tanto el dímero como el trímero, el grupo acetilo en C6 se elimina por hidrólisis estándar. Los ésteres metílicos del fosfonato se escindieron usando 1,8-diaza-7-biciclo[5.4.0]undeceno (DBU) como base junto con fenilmercaptano, para efectuar una desmetilación nucleófila. Entonces, los éteres bencílicos se escindieron junto con el benciloxicarbonilo mediante una hidrogenación reductora estándar, usando paladio sobre carbón vegetal activado como catalizador. Para hacer que la reacción se complete, se añadió HCl acuoso de manera que la amina resultante se protonara para formar el clorhidrato, que reduce su tendencia a envenenar el catalizador.

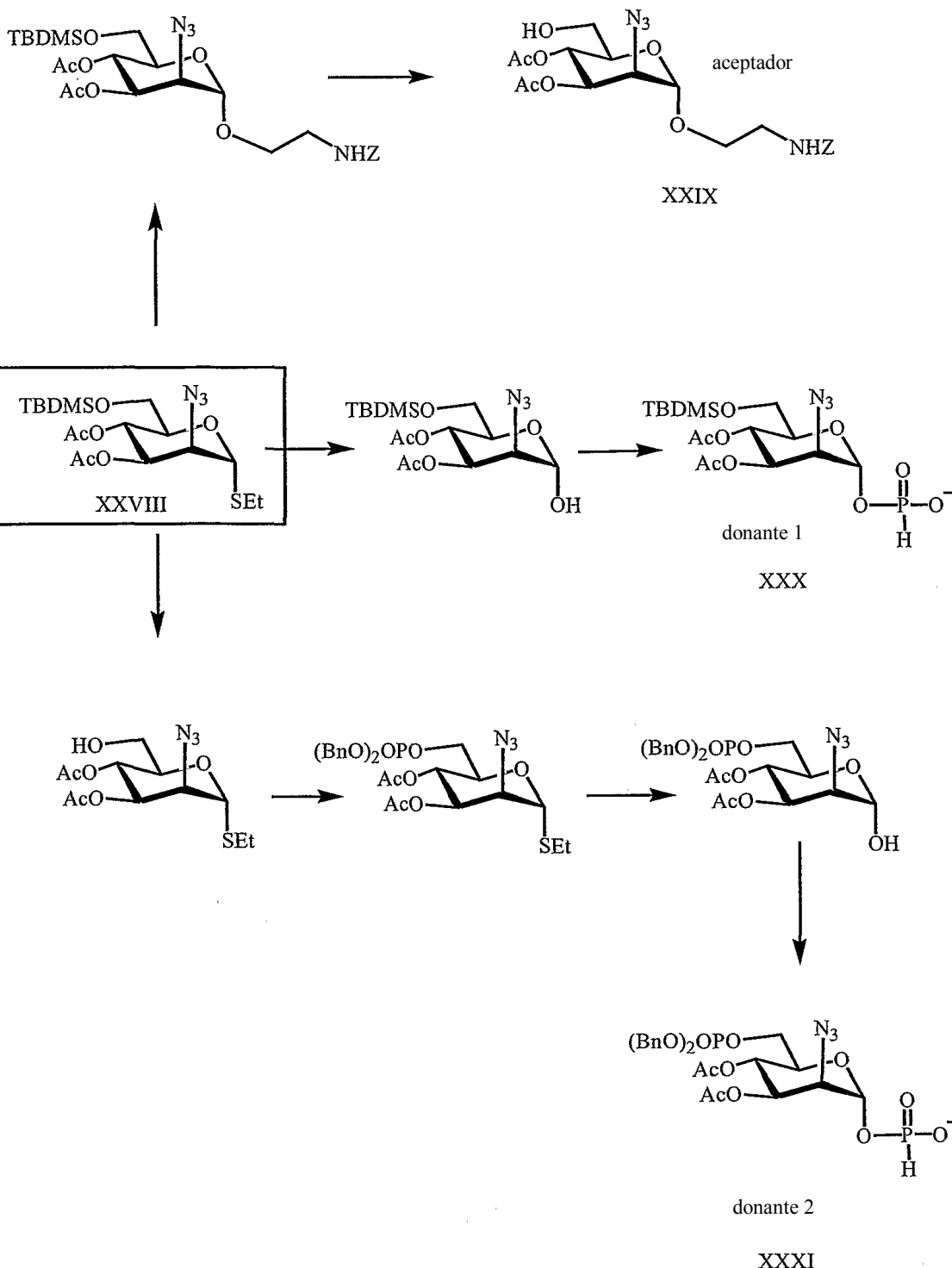
Los oligosacáridos de la invención pueden administrarse a un mamífero para provocar una respuesta inmunogénica; pueden usarse como se ha descrito anteriormente, normalmente después de desprotección al menos parcial. También pueden acetilarse parcial o completamente para ensanchar el espectro de la respuesta inmunitaria provocada. El PSC del organismo diana está sustancialmente acetilado sobre el hidroxilo C-3; así, la flexibilidad del presente método sintético hace posible preparar compuestos que contienen uno o más grupos acetilo, y particularmente para preparar dímeros, trímeros y oligómeros superiores que están parcial o completamente acetilados en el hidroxilo C-3, o mezclas de estos.

En lugar de, o además de, usar enlaces fosfonato para estabilizar el fosfodiéster, como se ha descrito anteriormente, es posible estabilizar el fosfodiéster a un grado útil incorporando un grupo azida como sustituyente aza C-2 durante las manipulaciones sintéticas hasta y opcionalmente durante la etapa de conjugación del oligosacárido con una proteína. Esta estabilización es inductiva, pero es adecuada para mejorar la estabilidad durante el procesamiento de los productos intermedios con respecto a la de los compuestos NHAc correspondientes. Una vez la azida ha servido a su fin, puede reducirse con borohidruro de níquel y acetilarse con anhídrido acético o agentes acilantes similares como se ha descrito en el presente documento. Los compuestos oligoméricos de la invención pueden así incorporar enlaces fosfodiéster a cierto grado como se ha descrito anteriormente, y los fosfodiésteres pueden incorporarse por métodos típicos y aquellos descritos en el presente documento.

Para tener la opción de conseguir tanto las moléculas diana con como sin acetatos, la estrategia del grupo protector se basó en acetatos como grupos protectores permanentes. Para estabilizar el enlace fosfodiéster anomérico se usó azida como precursor para el grupo acetamido en la medida de lo posible en la síntesis, como se ilustra en el

Esquema 7 a continuación. Las propiedades aceptoras de electrones y la ausencia de efecto participante de la azida protege fuertemente el enlace. Y después de problemas iniciales con el uso de dimetoxitritilo como grupo protector temporal para los 6-OH, los presentes inventores usaron TBDMS (éter t-butildimetilsilílico, algunas veces denominado TBS). Los éteres TBDMS se separaron por escisión con buen rendimiento con problemas mínimos debido a la migración o escisión del acetilo del enlace fosfodiéster lábil. No puso usarse TBAF, que se usó satisfactoriamente para la desprotección de éteres TBDMS en la síntesis de C-fosfonato previa, debido a la migración del acetilo, de manera que fue bastante lenta (especialmente cuando tiene azida en la pos 2), pero fidedigna si se usó TREAT-HF.

**Esquema 7**



Para una síntesis modular eficaz, se necesitaron tres unidades estructurales de monosacáridos; un monómero de

partida equipado con espaciador el aceptor 6-OH, un monómero de alargamiento de alfa-H-fosfonato con protección de 6-OH temporal (donante 1) y un monómero de alfa-H-fosfonato terminal fosforilado en la posición primaria (donante 2). Para lograr las moléculas diana con un fosfato en C-6, como se ejemplifica aquí como oligosacáridos trímeros, se usó un donante que contiene un fosfato protegido con dibencilo debido a que un intento en la modificación después del enlace del hidroxilo C-6 usando química de amidito fue insatisfactorio.

Para simplificar la síntesis, las tres unidades se sintetizaron a partir del mismo precursor, XXVIII, como se muestra en el Esquema 7 anterior. El material de partida se sintetizó usando métodos convencionales. Para preparar el aceptor, se acopló a un espaciador de etanolamina protegido con benciloxicarbonilo con un rendimiento del 86 % y el éter TBDMS se eliminó usando TREAT-HF para dar el aceptor XXIX con un rendimiento del 97 %.

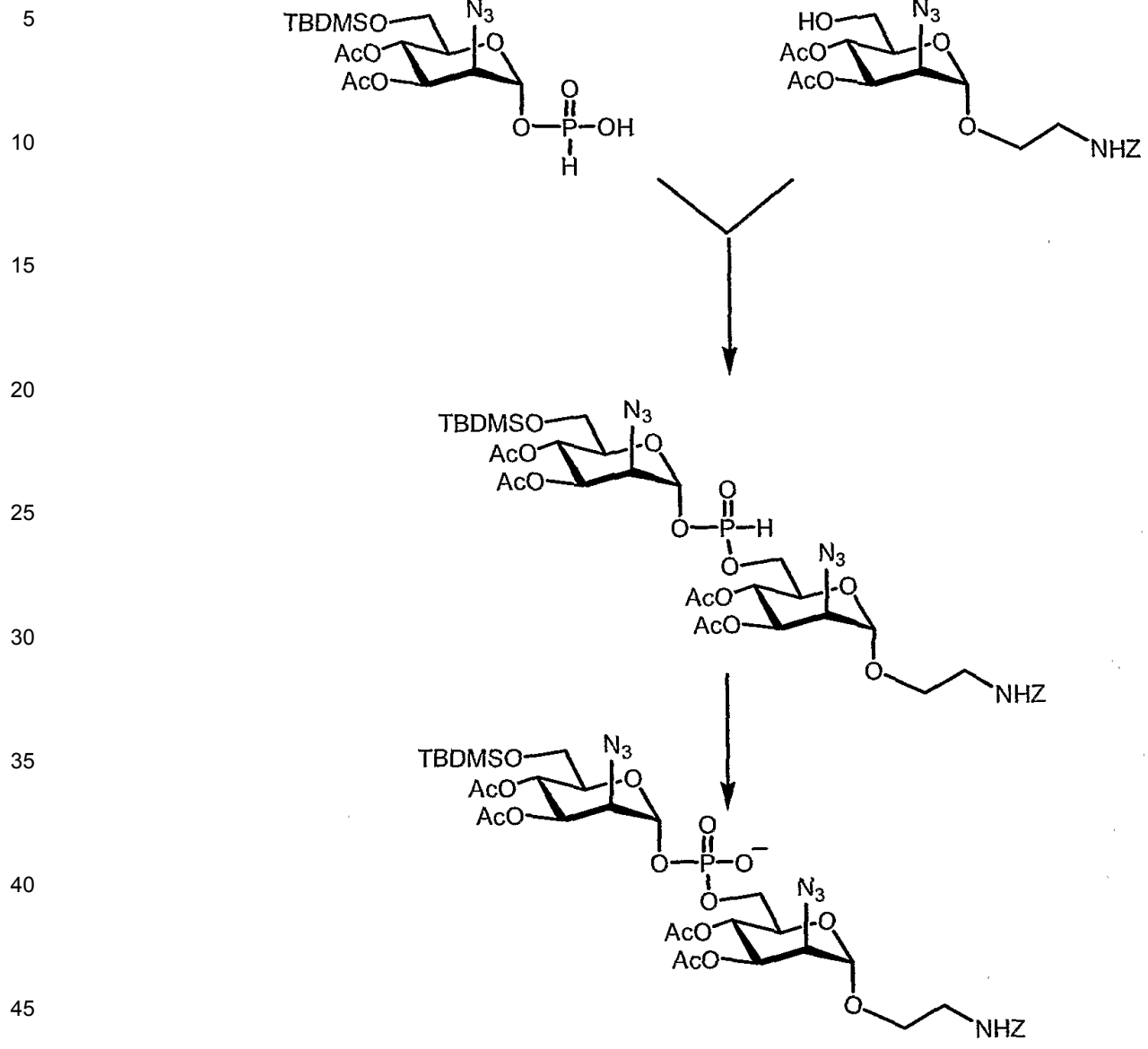
El donante 1 se sintetizó hidrolizando primero el tioglucósido usando una glucosilación con NIS como promotor y agua como aceptor a -20 °C. El alfa-anómero deseado se obtuvo exclusivamente con un rendimiento del 82 %. Si la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente, se forma un gran porcentaje de beta. Este compuesto se fosforiló a continuación usando  $\text{PCl}_3$ /imidazol dando XXX con un rendimiento del 97 %. Así, en el presente documento se desvela la preparación de alfa-anómeros a bajas temperaturas tales como inferiores a la temperatura ambiente, preferentemente inferiores a 0 °C, más preferentemente inferiores a -10 °C, tal como -20 °C o menos.

Para sintetizar unidades de manosa donantes que tienen el H-fosfonato, que es útil para añadir unidades de manosa ligadas a un oligosacárido de la invención mediante un enlace fosfodiéster, el éter TBDMS se escindió con un rendimiento del 75 % y el hidroxilo se fosforiló usando química de amidito para dar un fosfato protegido con bencilo en C-6 (67 %). El etiltioglucósido se hidrolizó del mismo modo que para el donante 1 acoplando a agua (79 %) y luego se fosforiló para dar la unidad de manosa donante de H-fosfonato XXXI con un rendimiento del 92 %.

El acoplamiento del monómero de alargamiento al aceptor se llevó a cabo usando química de H-fosfonato convencional con una condensación promovida por cloruro de pivaloilo como se ilustra en el Esquema 8 a continuación. El diéster de H-fosfonato se oxidó usando yodo elemental y agua para proporcionar el diéster de fosfato. El dímero se obtuvo con un buen rendimiento (96 %).



Esquema 8



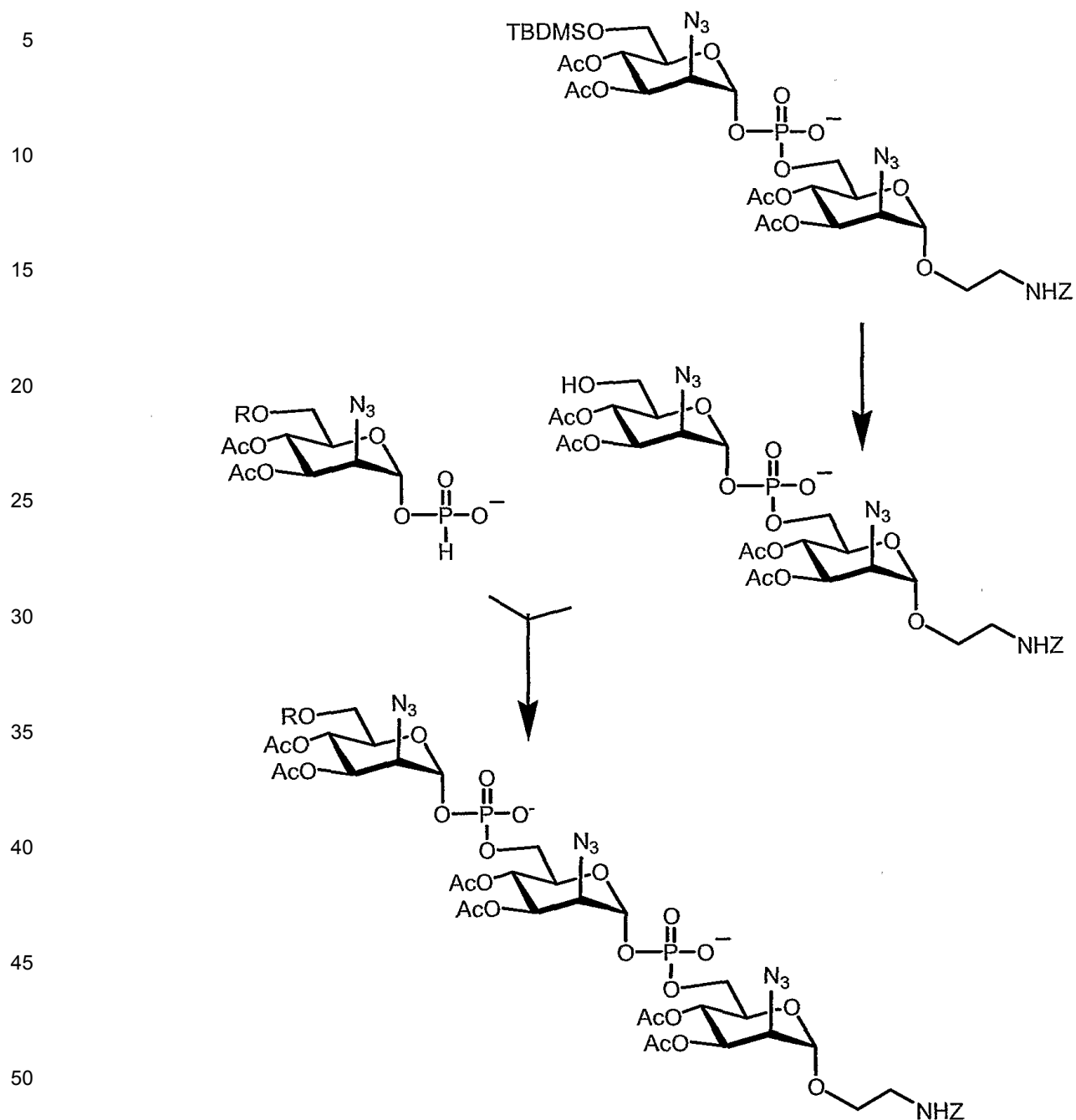
50 El alargamiento a trisacáridos se logra por desprotección del hidroxilo C-6 con TREAT-HF e iteración de la adición de un monómero de alargamiento; y la compatibilidad de la estrategia del grupo protector aquí con la ejemplificada en los esquemas anteriores para la construcción del enlace fosfonato permite mezclar los dos tipos de enlaces o que coincidan en un oligosacárido dado. El ejemplo aquí ilustra el alargamiento con las moléculas donantes XXX y XXXI, proporcionando un oligosacárido trímero que tiene tanto un hidroxilo C-6 sobre la última unidad de manosa como un O-fosfato C-6 en esa posición.

55

60

65

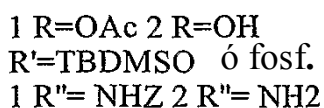
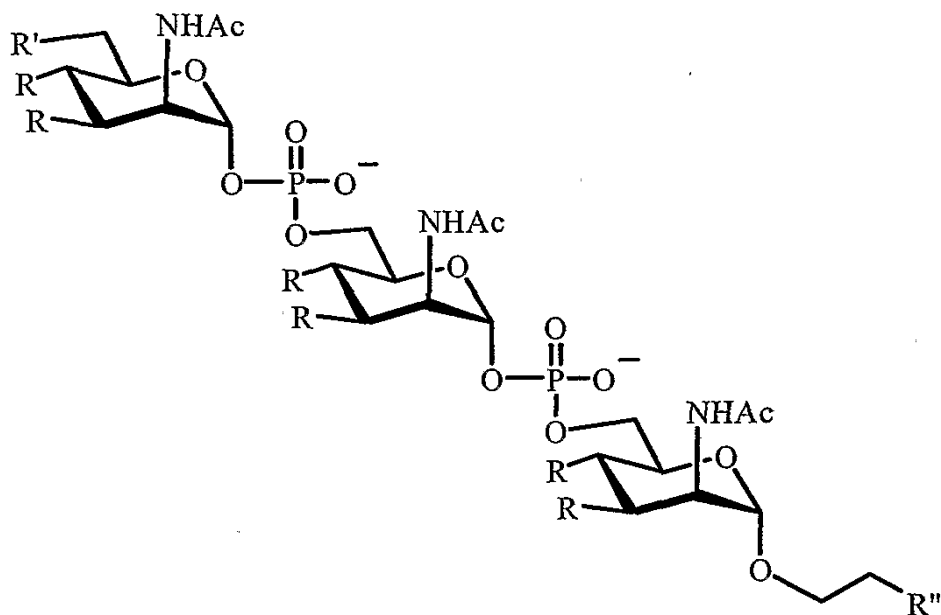
## Esquema 9



55 Para obtener el trisacárido, el éter TBDMS sobre el disacárido se eliminó con un rendimiento del 91 %, de nuevo usando TREAT-HF. El posterior acoplamiento de los dos donantes usando las mismas condiciones que se emplean para el acoplamiento al disacárido produjo la formación de los dos trisacáridos con un rendimiento del 62 % y 59 %, respectivamente. Los rendimientos obtenidos durante el segundo acoplamiento o posteriores fueron menores al obtenido de la primera etapa de acoplamiento, como se observa por Pozsgay y col. (véase, A. Berkin, B. Coxon y V. Pozsgay, Chem. Eur. J., 2002, 8, 4424.) Así, en realizaciones preferidas, al menos algunos de los enlaces entre unidades de manosa adyacentes en un oligosacárido normalmente comprenden un fosfonato en lugar de un fosfodiéster.

65 Las azidas sobre ambas formas de los oligómeros de la invención también pueden comprender un fosfato adicional en forma protegida en R' o su posición equivalente, por ejemplo, el grupo R<sup>6</sup> en dímeros y trímeros de los oligómeros

de fosfonato. Éste se introduce opcionalmente debido a que las unidades de manosa terminales en el PSC natural pueden estar fosforiladas, y el grupo fosforilo correspondiente puede introducirse como un éster de fosfato de dibencilo usando química convencional. Los grupos bencilo pueden entonces eliminarse junto con los éteres bencilicos en C-3 y/o C-4, por ejemplo, o junto con escisión reductora de un grupo benciloxycarbonilo que puede usarse para proteger un grupo amina en el resto de espaciador en la posición 1 de la primera unidad de manosa. El fosfonato de bencilo no interfiere con las otras reacciones necesarias para producir los oligómeros. Por ejemplo, las azidas en ciertos compuestos que contienen este grupo se redujeron satisfactoriamente a aminas usando borohidruro de sodio y una cantidad catalítica de cloruro de níquel hexahidratado, y las aminas resultantes se acetilaron con anhídrido acético dando los derivados de aminoacilo correspondientes. Esta reacción avanzó con un rendimiento del 89 % cuando el grupo terminal sobre una unidad de manosa en un compuesto ligado por fosfodiéster trimérico fue OTBDMS, y con un rendimiento del 64 % cuando ese grupo terminal fue un fosfato de dibencilo.



Los dos trisacáridos se desprotegeron en un orden diferente. Para lograr las moléculas diana 1 y 2, primero el grupo Z se desprotegió usando hidrogenación reductora (83 %). Para evitar problemas con la degradación del enlace fosfodiéster durante la hidrogenación reductora, se añadieron resina de intercambio iónico básica a la mezcla con buen resultado. El éter TBDMS se eliminó de nuevo usando TREAT-HF dando 1 con un rendimiento del 85 %. El acetato se escindió bajo condiciones estándar de metóxido de sodio / metanol. Para la molécula diana 3, Z se eliminó de la misma forma que en la desprotección previa de 1 (85 %) y para lograr 4 los acetatos se eliminaron (80 %) antes de la hidrogenación reductora (64 %).

Los métodos descritos en los esquemas anteriores también pueden usarse para preparar compuestos que tienen un C-fosfonato, tales como aquellos compuestos de fórmula (1) o (1'), descritos en el presente documento.

#### Uso de los compuestos como antígenos

Los oligosacáridos preparados por los métodos anteriores son inmunogénicos y son útiles para provocar una respuesta inmunitaria que protege contra infección por *N. meningitidis*, como en una vacuna. En particular, un oligosacárido que tiene la estructura mostrada en la fórmula (1) anterior puede provocar una respuesta inmunogénica si se administra a un mamífero y, por tanto, administrar la composición que comprende un oligosacárido de fórmula (1) es útil para provocar la formación de anticuerpos y/o para proporcionar una respuesta inmunogénica y para proporcionar resistencia al menos parcial o inmunidad parcial a infección por *N. meningitidis* A. Los compuestos que comprenden el resto en la fórmula (1), especialmente aquellos en la que W es CH<sub>2</sub> o O, X es O y Az es NHAc, son útiles como componente de vacunas, ya que son compuestos de fórmula (4).

Estos compuestos son especialmente útiles cuando se conjugan con una proteína, y opcionalmente el grupo Z de fórmula (1) puede usarse para enlazar el oligosacárido de fórmula (1) con una proteína. Asimismo, en otros compuestos de fórmula, el grupo en C-1 correspondiente de la primera unidad de manosa en un oligosacárido de la

invención puede ser un resto que puede usarse para conjugar el compuesto con una proteína transportadora para mejorar sus propiedades inmunogénicas. A pesar de la opción de enlazar mediante Z, sin embargo, los compuestos de la invención, y específicamente los compuestos que comprenden la estructura en la fórmula (1) o fórmula (4), pueden enlazarse por otros medios a una proteína transportadora, tal como mediante uno o más de los grupos hidroxilo o mediante un grupo acilo unido en lugar de un grupo acetilo sobre una de las acetilaminas sobre una de las unidades de manosa. Tales mecanismos de conjugación alternativos están dentro del alcance de la invención, en tanto que el centro C-1 (anómero) del oligosacárido siga en la configuración alfa deseada. Preferentemente, tales oligosacáridos comprenden al menos un enlace fosfonato entre dos unidades de manosa.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a vacunas que contienen como principio activo una cantidad inmunogénicamente eficaz de un oligosacárido inmunogénico como se describe en el presente documento. El (Los) oligosacárido(s) puede(n) introducirse en un huésped, que incluye seres humanos, tanto solos como ligados a un transportador tal como una proteína o como un homopolímero o heteropolímero de unidades de manosa o de otros sacáridos. En algunas realizaciones, se usan como glucoconjugados, y la proteína a la que el oligosacárido está conjugada está seleccionada por su capacidad para potenciar la respuesta inmunogénica al antígeno de oligosacárido: algunas veces se prefieren proteínas que han provocado una respuesta inmunitaria en el mamífero que va a tratarse. Los glucoconjugados tienen la ventaja de elevada actividad inmunológica y la capacidad adicional de inducir anticuerpos y/o CTL que reaccionan con diferentes determinantes antigénicos del virus o células tumorales.

Las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen al menos un compuesto de la invención, y pueden incluir opcionalmente más de un compuesto tal. Así, algunas veces es deseable mezclar juntos dos o más compuestos de la invención para ampliar la respuesta inmunogénica provocada. Por ejemplo, es frecuentemente deseable combinar un compuesto en el que R<sup>3</sup> es H con un compuesto en el que R<sup>3</sup> es Ac, ya que el PSC del organismo diana está parcialmente, pero no completamente, acetilado en esta posición. Así, en algunas realizaciones, las composiciones inmunogénicas comprenden al menos dos y opcionalmente tres o más de tales compuestos inmunogénicos y / o conjugados de proteína de tales compuestos.

Similarmente, las proteínas transportadoras pueden influir en la respuesta inmunogénica e incluso afectar la naturaleza precisa de los anticuerpos que resultan del tratamiento de un mamífero con uno o más compuestos de la invención cuando se administran como glucoconjugados. Por tanto, la invención incluye composiciones que comprenden más de una proteína transportadora, tanto si comprenden como si no dos o más oligosacáridos.

Proteínas transportadoras útiles son muy conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas tales como albúmina de suero humano, toxoide tetánico, toxoide diftérico, poliaminoácidos tales como poli(lisina:ácido glutámico), gripe, proteína del núcleo del virus de la hepatitis B, vacuna recombinante del virus de la hepatitis B y similares. También podrían usarse proteínas de la membrana externa bacterianas tal como, complejo c de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumólisis, proteína de la superficie A neumocócica (PspA), o proteína adhesina pneumocócica (PsaA). También pueden usarse otras proteínas, tales como albúmina de huevo, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD) como proteínas transportadoras. Las proteínas transportadoras son preferentemente proteínas que no son tóxicas y no reactogénicas y obtenibles en cantidad y pureza suficientes.

Las proteínas transportadoras deben ser susceptibles a procedimientos de conjugación estándar. En una realización preferida de la presente invención, se usa toxina diftérica purificada de cultivos de *Corynebacteria diphtheriae* y se desintoxica químicamente usando formaldehído como proteína transportadora. En otras realizaciones, se usó CRM197.

Los métodos para unir un oligosacárido a una proteína transportadora son convencionales, y un profesional habitual puede crear glucoconjugados que comprenden los compuestos de la invención usando métodos convencionales. También está disponible orientación en muchas publicaciones y en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.356.170; 4.619.828; 5.153.312; 5.422.427; y 5.445.817.

En una realización tal, usando 2-aminoetoxi como resto de espaciador en C-1 de la primera unidad de manosa y un enlace fosfodiéster, y usando tanto ácido subérico o escuarato como el reactivo bifuncional para conectar el resto de espaciador a la proteína transportadora, y usando CRM197 como proteína transportadora, se prepararon glucoconjugados. Según el análisis de espectros de masa de MALDI-TOF, estos conjugados contuvieron aproximadamente cinco moléculas de oligosacárido, en promedio, por molécula de proteína transportadora. Sin embargo, las relaciones de oligosacárido:proteína transportadora de aproximadamente 0,1 a aproximadamente uno en una relación molar son frecuentemente deseables, y relaciones molares de aproximadamente 1-30:1 o aproximadamente 1-10:1 están dentro del alcance de la invención, independientemente de qué proteína transportadora se utiliza. La relación de oligosacárido con respecto a proteína transportadora también puede caracterizarse como una relación de peso entre las dos; frecuentemente se prefieren relaciones de aproximadamente 1:1 a 1:500. La relación precisa depende de la relación del peso molecular de la proteína y el oligosacárido; para oligosacáridos más pequeños, algunas veces se usa una relación de peso de 1:5 a 1:200.

Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína transportadora, los conjugados de polisacárido-proteína pueden purificarse (enriquecerse con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante una variedad de técnicas. Un objetivo de la etapa de purificación es eliminar el polisacárido no unido del conjugado de polisacárido-proteína. Un método para la purificación, que implica ultrafiltración en presencia de sulfato de amonio, se describe en la patente de EE.UU. 6.146.902. Alternativamente, pueden purificarse conjugados de proteína sin reaccionar y polisacárido por cualquier número de técnicas convencionales que incluyen, entre otras, cromatografía de exclusión por tamaño, centrifugación en gradiente de densidad, cromatografía de interacción hidrófoba o fraccionamiento con sulfato de amonio. Véase, por ejemplo, Anderson, P. W., y col., J. Immunol. (1986) 137:1181-1186. Véase también Jennings, H. J., y col., J. Immunol. (1981) 127:1011-1018.

Las vacunas de la invención comprenden al menos un compuesto inmunogénico de la invención, y también pueden contener un diluyente fisiológicamente tolerable (aceptable) tal como agua, solución salina tamponada con fosfato, o solución salina, y adicionalmente normalmente incluyen un adyuvante. La patente de EE.UU. n° 6.869.607 proporciona adyuvantes no iónicos para inmunógenos conjugados con proteína y trata otros adyuvantes adecuados. Materiales tales como adyuvante incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o alumbre, sulfato de aluminio, fosfato de aluminio, y combinaciones de los mismos, son materiales muy conocidos en la técnica como adyuvantes. También son útiles BAY, DC-chol, pcpp, monofosforil lípido A, CpG, QS-21, toxina del cólera y péptido formil metionil, además de formulaciones en emulsión que incluyen MF59, SAF, escualano, Tween, polímero L121 con bloques de Pluronic, y componentes tales como monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa, y esqueleto de la pared celular. También pueden incluirse citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, interferones y factor de necrosis tumoral (TNF). En algunas realizaciones preferidas de la invención, se usa alumbre como adyuvante.

Tras la inmunización con una composición como se describe en el presente documento, mediante inyección, aerosol, vía oral, transdérmica u otra vía, el sistema inmunitario del huésped responde a la vacuna produciendo grandes cantidades de CTL específicos para el antígeno deseado, y el huésped se vuelve al menos parcialmente inmune a la posterior infección por el patógeno *N. meningitidis*.

Las vacunas y composiciones farmacéuticas de la invención están previstas para administración parenteral, tópica, oral o local. Preferentemente, se administran parenteralmente, por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente, intradérmicamente o intramuscularmente. Así, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden una disolución del resto inmunogénico disuelto o suspenso en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo principalmente acuoso. Puede usarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,8 %, 0,3 % de glicina, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse por filtración. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como tales, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución estéril antes de administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como ajuste de pH y agentes de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato de sodio, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, etc. La preparación de tales composiciones farmacéuticas está dentro de la experiencia habitual en la materia, y puede guiarse por libros de referencia estándar tales como Remington's Pharmaceutical Science, última ed.

En realizaciones preferidas, una composición de vacuna que comprende al menos un resto de fórmula (1) o fórmula (4) en una mezcla sustancialmente acuosa se formula como una solución salina tamponada libre de pirógenos estéril o disolución que contiene fosfato, que puede incluir un conservante o puede estar libre de conservante. Conservantes adecuados incluyen, por ejemplo, alcohol bencílico, parabenos, timerosal, clorobutanol y cloruro de benzalconio. La disolución es preferentemente aproximadamente isotónica, y su tonicidad puede ajustarse con agentes tales como tartrato de sodio, cloruro sódico, propilenglicol y fosfato de sodio.

La concentración de los oligosacáridos inmunogénicos de la invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente el 0,1 %, normalmente del 0,1 % al menos aproximadamente el 0,1 % a como mucho del 20 % al 50 % o más en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., y según el modo particular de administración seleccionada. Una forma de dosis unitaria humana de los compuestos y composición normalmente se incluye en una composición farmacéutica que comprende una dosis unitaria humana de un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso, y se administra en un volumen de fluido que es conocido por aquellos expertos en la materia que va a usarse para la administración de tales composiciones a seres humanos, y se ajusta según principios comúnmente entendidos para un sujeto particular que va a tratarse. Así, en una realización, la invención proporciona una unidad dosificación del componente de vacunas de la invención en una cantidad adecuada de una disolución acuosa, tal como 0,1-3 ml, preferentemente 0,2-2 ml.

Los inmunógenos de la invención también pueden administrarse mediante liposomas, que pueden servir para concentrarlos en un tejido particular, tal como tejido linfóide, o para potenciar su actividad o características de administración. Están disponibles una variedad de métodos para preparar liposomas, como se describen en, por

ejemplo, Szoka, y col., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. (1980) 9:467, patentes de EE.UU. n° 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Para composiciones sólidas, pueden usarse vehículos sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Para administración por vía oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes normalmente empleados, tales como aquellos vehículos previamente enumerados, y una dosificación unitaria de un principio activo, es decir, uno o más compuestos de la invención, tanto conjugados con una proteína como no.

Para la administración por aerosol, los compuestos inmunogénicos se suministran preferentemente en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y propulsor. El tensioactivo debe, por supuesto, ser no tóxico, y preferentemente soluble en el propulsor. Representativos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, tales como ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, estearico, linoleico, linoléico, oleostérico y oleico con un alcohol polihidroxiado alifático o su anhídrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir el 0,1 %-20 % en peso de la composición, preferentemente el 0,25-5 %. El resto de la composición es generalmente propulsor. También puede incluirse un vehículo, según se desee, como con, por ejemplo, lecitina para administración intranasal.

Cantidades eficaces para este uso dependerán, por ejemplo, de la composición del oligosacárido, si está conjugado con una proteína, el modo de administración, el peso y estado general de salud del paciente y el criterio del médico que receta, pero generalmente oscilan para la inmunización inicial (que es para una administración profiláctica) de aproximadamente 1,0 µg a aproximadamente 5.000 µg de péptido para un paciente de 70 kg (por ejemplo, 1,0 µg, 1,5 µg, 2,0 µg, 2,5 µg, 3,0 µg, 3,5 µg, 4,0 µg, 4,5 µg, 5,0 µg, 7,5 µg, 10 µg, 12,5 µg, 15 µg, 17,5 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 35 µg, 40 µg, 45 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1.000 µg, 1.500 µg, 2.000 µg, 2.500 µg, 3.000 µg, 3.500 µg, 4.000 µg, 4.500 µg o 5.000 µg). La dosis actual administrada a un sujeto se determina frecuentemente según una cantidad apropiada por kg del peso corporal del sujeto. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede ser aproximadamente 0,1 a 5 µg/kg de peso corporal.

Una dosis primaria puede ir opcionalmente seguida de dosificaciones de refuerzo de aproximadamente 1,0 µg a aproximadamente 1.000 µg de péptido (por ejemplo, 1,0 µg, 2,0 µg, 2,5 µg, 3,0 µg, 3,5 µg, 4,0 µg, 4,5 µg, 5,0 µg, 7,5 µg, 10 µg, 12,5 µg, 15 µg, 17,5 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 35 µg, 40 µg, 45 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1.000 µg, 1.500 µg, 2.000 µg, 2.500 µg, 3.000 µg, 3.500 µg, 4.000 µg, 4.500 µg o 5.000 µg) conforme a una pauta de refuerzo durante semanas a meses que depende de la respuesta y condición del paciente midiendo la actividad de linfocitos T específicos en la sangre del paciente.

Las composiciones inmunogénicas que comprenden un compuesto de la invención son adecuadas para su uso en seres humanos adultos o en niños, y en algunas realizaciones se administran a niños jóvenes, que están en riesgo de contraer meningitis producida por *N. meningitidis*. Opcionalmente, una composición tal puede administrarse en combinación con otras sustancias farmacéuticamente activas, y frecuentemente se administrarán en combinación con otras vacunas como parte de un programa de vacunación infantil. Composiciones para administración pueden incluir beneficiosamente otros tipos de compuestos inmunogénicos tales como glucoconjugados que provocan una respuesta inmunitaria para proporcionar también protección contra otros patógenos de meningitis. Así, en algunas realizaciones, las composiciones de vacuna de la invención incluyen al menos un antígeno derivado de otro serotipo de *Meningitidis*, normalmente de al menos uno de los serotipos A, B, C, W135 e Y. Realizaciones preferidas comprenden frecuentemente antígenos para al menos uno y frecuentemente dos o todos de los serotipos C, Y y W135 en combinación con al menos uno y opcionalmente dos o más compuestos que comprenden un oligosacárido de la presente invención.

## EJEMPLOS

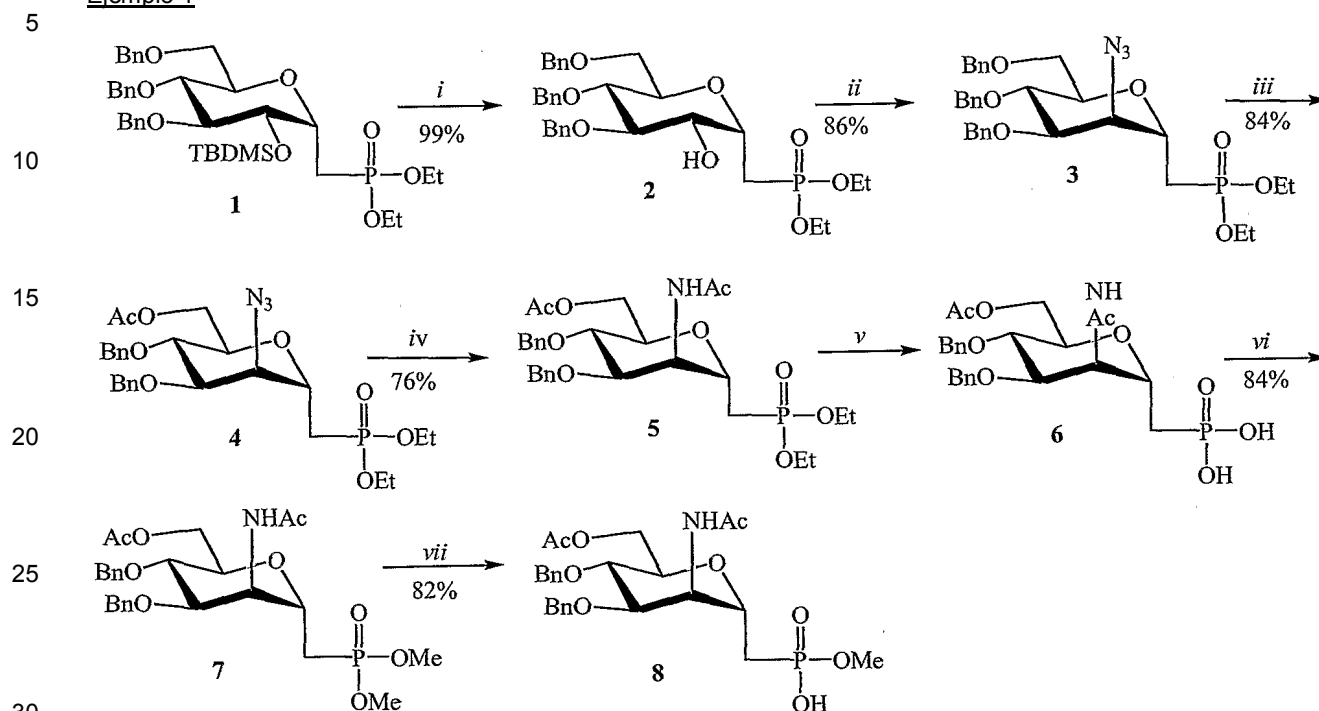
Los siguientes ejemplos ilustran ciertas realizaciones de la invención, pero de ninguna forma limitan su alcance. Otras variaciones de las reacciones y formulaciones ejemplificadas serán evidentes para aquellos expertos en la materia, y también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, cambiar el orden de las etapas, o modificar la estrategia de grupos protectores seleccionada, representan frecuentemente elecciones típicas hechas por el profesional habitual. La numeración de compuestos en la siguiente sección no se correlaciona con la numeración de compuestos en los esquemas de reacción proporcionados anteriormente, y se proporciona para comodidad del lector.

### Métodos generales

Se llevó a cabo CCF sobre placas 60 F<sub>254</sub> previamente recubiertas de Merck usando AMC (molibdato de amonio - sulfato de cerio (IV) - ácido sulfúrico al 10 % 100 g:2 g:2 l) o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 8 % para visualización. Se realizó cromatografía en columna sobre gel de sílice (0,040-0,063 mm, Amicon) o gel de fase inversa (C18 60A 40-63 µm). Los espectros de RMN se registraron en CDCl<sub>3</sub> (Me<sub>4</sub>Si externo, δ= 0,00) o D<sub>2</sub>O (acetona interna <sup>13</sup>C δ= 30,89, <sup>1</sup>H

=2,22) a 25 °C en un instrumento Varian de 300 MHz o 400 MHz. Las disoluciones orgánicas se concentraron a 30 °C a presión reducida.

### Ejemplo 1



Clave: i) TBAF; ii) Ph<sub>3</sub>P, DIAD, DPPA, THF; iii) HOAc, Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; iv) a. NaBH<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, b. Ac<sub>2</sub>O; v) Me<sub>3</sub>SiBr; vi) MeC(OMe)<sub>3</sub>, HOAc; vii) PhSH, Et<sub>3</sub>N.

35 **C-(3,4,6-tri-O-bencil- $\alpha$ -D-glucopiranosil)metanofosfonato de dietilo (2)**. Se añadió TBAF (2,6 g, 1,3 eq) a una disolución de C-(2-O-tertbutyldimetilsilil-3,4,6-tri-O-bencil- $\alpha$ -D-glucopiranosil)metanofosfonato de dietilo (1, 5,36 g, 7,7 mmoles) en THF (150 ml). Después de 20 min el disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice dando **2** (4,44 g, 7,6 mmoles, 99 %).

40 **C-(2-azido-3,4,6-tri-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-mannopiranosil)metanofosfonato de dietilo (3)**. Se añadió gota a gota DIAD (2,4 ml, 12,4 mmoles) a una disolución enfriada (-5 °C) de Ph<sub>3</sub>P (3,1 g, 11,7 mmoles) en THF (50 ml). Después de 30 min, se añadió una disolución de **2** (5,57 g, 9,5 mmoles) en THF (20 ml). Después de 10 min adicionales, se añadió fosforazidato de difenilo (DPPA; 2,4 ml, 11,31 mmoles) y se dejó que la mezcla de reacción alcanzara TA. Después de agitar durante la noche, el disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice dando **3** (5,0 g, 8,2 mmoles, 86 %) como un aceite incoloro. RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) 138,17, 137,92, 137,38, 128,6-127,7, 78,2, 74,3, 73,9, 73,7, 73,5, 72,4, 69,5, 68,8, 62,2, 62,1, 62,0, 61,9, 61,0, 60,9, 27,9 (d, J=141 Hz), 16,5, 16,4; RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) 27,9.

50 **C-(6-O-acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato de dietilo (4)**. Se disolvió el compuesto **3** (3,2 g, 5,2 mmoles) en HOAc/Ac<sub>2</sub>O (1:1, 32 ml). Se añadieron diez gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 % en Ac<sub>2</sub>O. Después de agitar durante la noche, la mezcla se vertió en un embudo de decantación que contenía hielo y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se separó, se filtró a través de un tapón de sílice y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna dando **4** (2,48 g, 4,4 mmoles, 84 %). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) 170,41, 137,41, 136,95, 128,34-127,75, 77,77, 77,60, 74,01, 73,39, 72,17, 71,89, 69,26, 62,47, 61,82, 61,73, 60,50, 60,37,27,57 (d, J=141 Hz), 20,59, 16,27, 16,19; RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) 27,50; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>+37 (c 1,0, CHCl<sub>3</sub>).

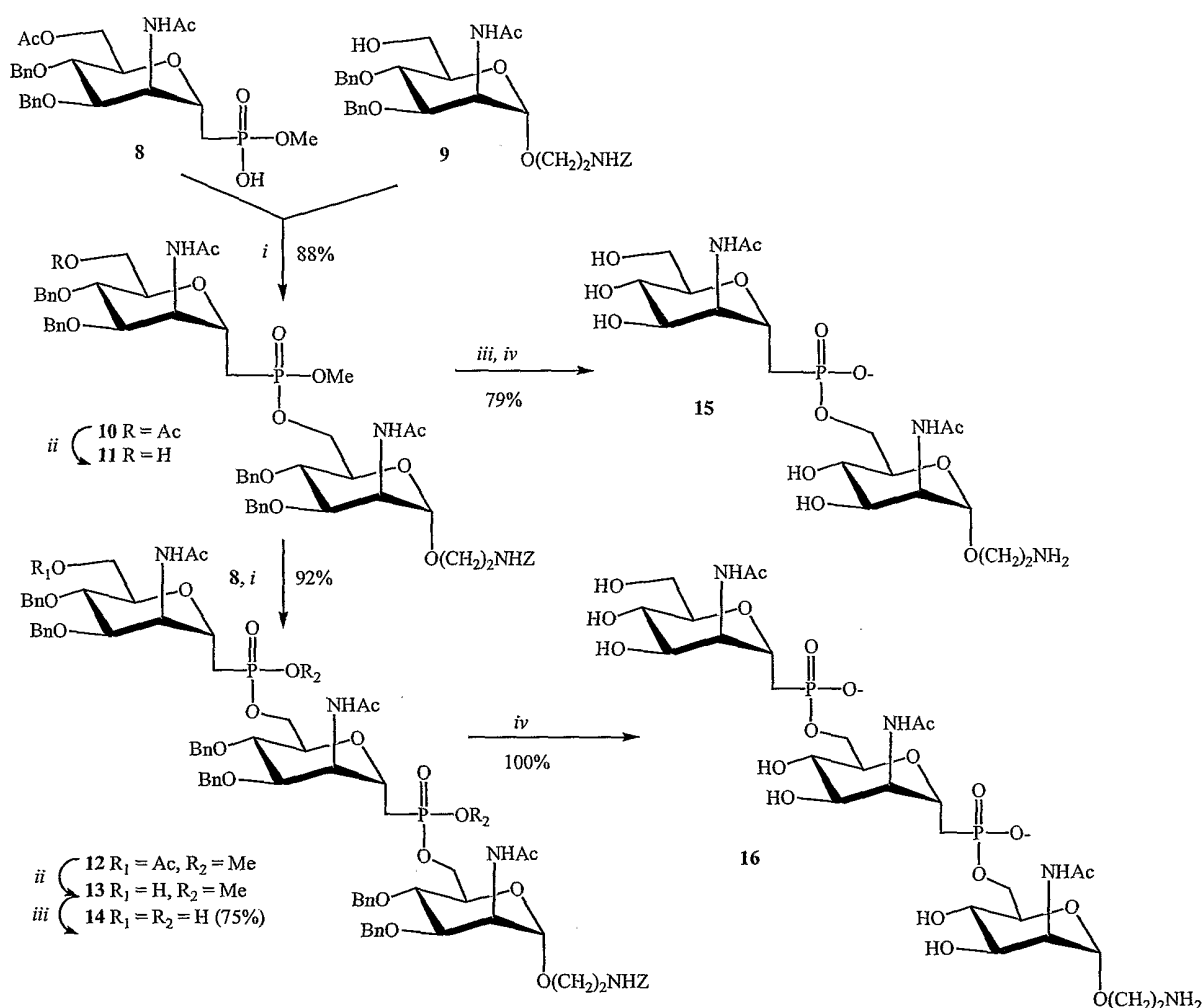
60 **C-(6-O-acetil-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato de dietilo (5)**. A una disolución con agitación de **4** (2,50 g, 4,45 mmoles) en MeOH (125 ml) se añadió una cantidad catalítica de NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O seguido de porciones de NaBH<sub>4</sub> (en total 0,34 g, 8,9 mmoles) cada 10 min hasta que no se observó material de partida en CCF (sistema). Se añadió Ac<sub>2</sub>O (3 ml) después de 50 min y la mezcla de reacción se diluyó con tolueno, se filtró a través de un tapón de sílice y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice dando **5** (1,95 g, 3,4 mmoles, 76 %). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) 170,4, 169,7, 137,3, 137,0 C aromático restante 128,5-127,7, 75,3, 72,6, 72,4, 72,1, 72,0, 67,1, 61,91, 61,8, 61,8, 61,3, 61,2, 48,8, 48,6, 28,5 (d, J=142 Hz), 23,0, 20,6, 16,3, 16,2, 16,1; RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) 29,5.

65 **C-(6-O-acetil-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato de dimetilo (7)**. A una

disolución de **5** (0,25 g, 0,43 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (5 ml) se añadió bromotrimetilsilano (0,28 ml, 2,2 mmoles, 5 eq) a ta. Después de completarse la adición, la mezcla se agitó a ta durante 1 h. La disolución se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se añadió  $\text{Et}_3\text{N}$  (1 ml), seguido de la adición de agua (1 ml). Después de 10 min los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se desaló por cromatografía RP (agua-agua/MeOH 1:1). El producto *C*-(6-*O*-acetil-2-acetamido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato (**6**) se metiló sin más purificación. Al producto de la reacción descrito anteriormente se añadieron AcOH (5,5 ml) y ortoacetato de trimetilo (11,5 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 30 min y a continuación se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice dando **7** (0,20 g, 0,36 mmoles, 84 % durante dos etapas). (La reacción tuvo que monitorizarse cuidadosamente y se detuvo exactamente cuando la reacción se completa, de otro modo el resultado es una mezcla del producto deseado y el producto en el que el 6-*O*Ac se desprotege.)  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 170,6, 170,0, 137,4, 137,1, C aromático restante 129,9-127,4, 75,3, 73,0, 72,5, 72,4, 72,0, 66,7, 61,8, 52,9, 52,8, 52,2, 52,1, 49,0, 48,7, 28,0 (d,  $J=142$  Hz), 23,2, 20,8;  $\text{RMN}^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 31,6.

**C**-(6-*O*-acetil-2-acetamido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato de metilo (**8**). A una disolución de **7** (1,35 g, 2,46 mmoles) en THF (2 ml) se añadieron tiofenol (1,0 ml, 9,83 mmoles) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (2,0 ml, 14,7 mmoles). Después de 48 h la mezcla de reacción se puso directamente sobre una columna de gel de sílice y primero se eluyó con tolueno y a continuación con  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1 que contenía 1,5 % de TEA dando **8** (1,28 g, 2,01 mmoles, 82 %).  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 169,5, 169,1, 137,1, 137,1, C aromático restante, 127,4-126,7, 75,0, 72,6, 72,1, 71,6, 71,2, 62,0, 51,7, 50,6, 50,5, 49,5, 28,6 (d,  $J=129$  Hz), 22,4, 22,3, 19,9;  $\text{RMN}^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 20,4;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +15$  (c 1,0,  $\text{CHCl}_3$ ).

El siguiente esquema se aplica al resto del Ejemplo 1 y Ejemplo 2-6.



Clave: *i*)  $(p\text{ClPh})_3\text{P}$ , DIAD,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF; *ii*) KOH, MeOH; *iii*)  $\text{PhSH}$ , DBU,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ;

*iv*)  $\text{H}_2$ , Pd/C, HCl.



**6-O-[metil-C-(6-O-acetil-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato]-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido de 2-carboxibencilamidoetilo (10).** A una disolución de **8** (50 mg, 0,093 mmoles), tris(4-clorofenil)fosfina (38 mg, 0,10 mmoles), 2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido de 2-carboxibencilamidoetilo (9,42 mg, 0,072 mmoles), Et<sub>3</sub>N (0,050 ml, 0,36 mmoles) en THF (0,5 ml) se añadió DIAD (0,021 ml, 10,4 mmoles). Después de 45 min el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (EtOAc seguido de CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1) seguido de más purificación sobre una columna de gel LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1) dando el producto **10** (70,1 mg, 0,064 mmoles, 88 %) como una mezcla diaestereomérica.

#### Ejemplo 2

**6-O-[metil-C-(2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato]-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido de 2-carboxibencilamidoetilo (11).** A una disolución de **10** (73 mg, 0,066 mmoles) en MeOH (2 ml) se añadieron KOH (7,4 mg, 0,13 mmoles) de una disolución madre de KOH disuelta en MeOH. Después de 25 min la mezcla de reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se filtró a través de un tapón de sílice y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se purificó sobre una columna LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1) dando **11** (70 mg 0,066 mmoles, 100 %).

#### Ejemplo 3

**6-O-[metil-C-(6-O-[metil-C-(6-O-acetil-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato]-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato]-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido de 2-carboxibencilamidoetilo (12).** A una disolución de **8** (27 mg, 0,051 mmoles), tris(4-clorofenil)fosfina (19 mg, 0,052 mmoles), **11** (38 mg, 0,036 mmoles) y Et<sub>3</sub>N (0,025 ml, 0,18 mmoles) en THF (0,5 ml) se añadió DIAD (0,010 ml, 0,052 mmoles). Después de 40 min la mezcla de reacción se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice (EtOAc seguido de CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1). Los productos se purificaron adicionalmente sobre una columna LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1) dando **12** (52 mg, 0,033 mmoles, 92 %).

#### Ejemplo 4

**6-O-[metil-C-(6-O-[metil-C-(2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)fosfonato]-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido de 2-carboxibencilamidoetilo (14).** A una disolución de **12** (67 mg, 0,043 mmoles) en MeOH (2 ml) se añadieron KOH (4,7 mg, 0,085 mmoles, 2 eq) de una disolución madre de KOH disuelta en MeOH. Después de 25 min la mezcla de reacción se diluyó con DCM, se filtró a través de un tapón de sílice y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se purificó sobre una columna LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1) dando **13** (65 mg, 0,042 mmoles, 100 %). A una disolución de **13** (36 mg, 0,024 mmoles) en acetonitrilo (0,5 ml) se añadieron tiofenol (0,096 ml, 0,94 mmoles, 40 eq) y DBU (0,070 ml, 0,47 mmoles, 20 eq). Después de 2,5 h el disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en gel de sílice (tolueno seguido de CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1+1,5 % de TEA). Los productos se purificaron adicionalmente sobre una columna LH-20 (MeOH+1,5 % de TEA) dando **14** (30 mg, 0,018 mmoles, 75 %). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>): 21,2, 22,4.

#### Ejemplo 5

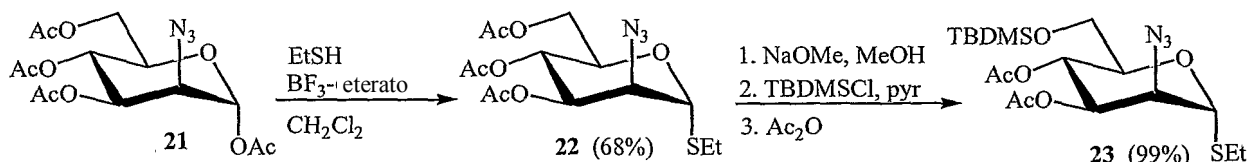
**6-O-[C-(2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato]-2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido de 2-aminoetilo (15).** A una disolución de **11** (35,1 mg, 0,033 mmoles) en acetonitrilo (0,5 ml) se añadieron tiofenol (0,066 ml, 0,64 mmoles, 20 equiv.) y DBU (0,048 ml, 0,32 mmoles, 10 equiv.). Después de 2 h el disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en gel de sílice (tolueno seguido de CHCl<sub>3</sub>/MeOH 20:1+1,5 % de TEA). Los productos se purificaron adicionalmente sobre una columna LH-20 (MeOH 1,5 % de TEA) dando 6-O-[C-(2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato]-2-acetamido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido de 2-(benciloxicarbonil)aminoetilo (30 mg, 2,63 mmoles, 79 %). RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD) 173,55, 172,57, 158,72, 139,94, 139,66, 139,64, 139,39, 138,24, C aromático restante 130,36-125,05, 100,26, 78,86, 77,82, 76,03, 75,90, 75,18, 74,60, 74,19, 72,85, 72,27, 72,20, 71,97, 67,36, 67,25, 64,57, 61,09, 54,66, 51,28, 51,16, 50,56, 41,43, 29,94 (d, J=135 Hz), 22,59, 22,43. A una disolución de este producto (10 mg) en EtOH (4 ml) se añadió HCl en agua (0,1 M, 0,25 ml), seguido de una cantidad catalítica de Pd sobre carbono. Después de agitar durante la noche bajo a 100 psi de atmósfera de hidrógeno, la disolución se neutralizó con acetato sódico. La mezcla de reacción se filtró a través de un tapón de gel de sílice de fase inversa y la RMN <sup>31</sup>P mostró conversión completa del material de partida en un único producto, que se purificó adicionalmente sobre una columna P2-Biogel dando **15** (100 %) después de la liofilización. RMN (D<sub>2</sub>O): <sup>31</sup>P 23,1; <sup>13</sup>C 22,5, 22,6, 26,7, 28,5, 30,9, 39,5, 47,2, 52,8, 53,1, 53,3, 60,0, 63,6, 63,9, 66,8, 67,8, 69,1, 69,6, 72,0, 72,1, 73,1, 74,5, 99,3, 174,8, 175,4.

#### Ejemplo 6

**6-O-[C-(6-O-[C-(2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil)metanofosfonato]-2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-**

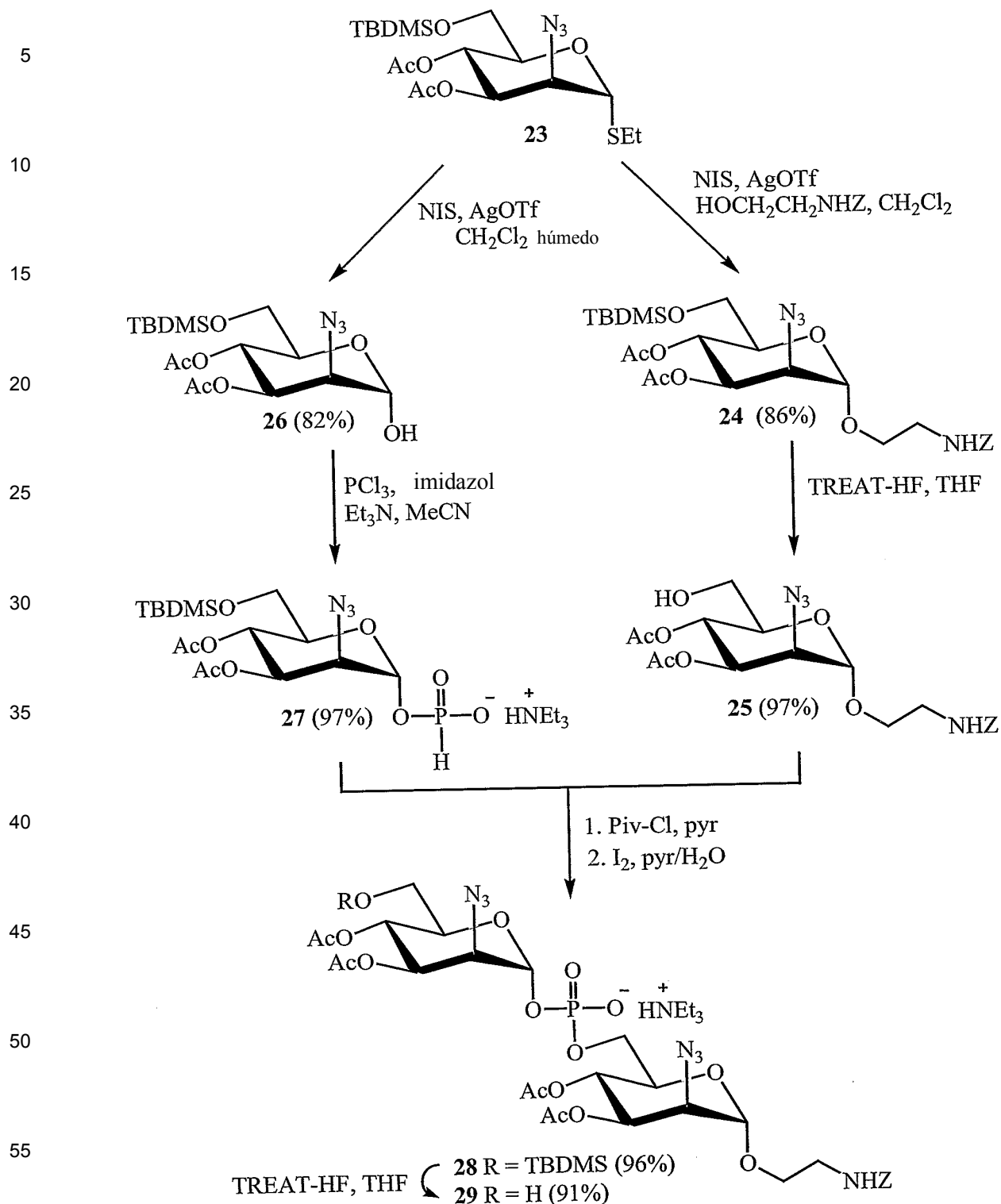
manopiranosil)metanofosfonato]-2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido de 2-aminoetilo (**16**). A una disolución de **14** (12 mg) en EtOH (4 ml) se añadió HCl en agua (0,1 M, 0,25 ml), seguido de una cantidad catalítica de Pd sobre carbono. Después de agitar durante la noche bajo a 100 psi de atmósfera de hidrógeno, la disolución se neutralizó con acetato sódico. La mezcla de reacción se filtró a través de un tapón de gel de sílice de fase inversa y la RMN  $^{31}\text{P}$  mostró conversión completa del material de partida en un único producto, que se purificó adicionalmente sobre una columna P2-Biogel dando **16** (100 %). RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $^{31}\text{P}$  22,72, 22,75;  $^{13}\text{C}$  22,5, 22,7, 23,9, 26,9, 28,7, 30,9, 39,5, 47,1, 52,8, 53,2, 53,3, 60,9, 63,6, 64,0, 66,9, 67,3, 67,8, 69,2, 69,5, 69,7, 72,1, 72,2, 73,2, 74,2, 74,5, 99,4, 174,8, 175,4.

#### Ejemplo 7a



**3,4,6-tri-O-acetil-2-azido-2-desoxi-1-tio- $\alpha$ -D-manopiranosido de etilo (**22**)**. A una disolución de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-azido-2-desoxi-D-manopiranosido (**21**) (5,04 g, 13,5 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 ml) se añadió EtSH (1,6 ml, 21,6 mmoles) y EM (4Å). La mezcla se agitó bajo argón a ta durante 30 min. Entonces se añadió  $\text{BF}_3$ -eterato (4,8 ml, 38,1 mmoles) disuelto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) durante 1 h. Después de 7 h la mezcla se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado, se filtró (sílice) y se concentró. Cromatografía (1:0  $\rightarrow$  1:1 de tolueno-EtOAc) dio **22** (3,46 g, 9,22 mmoles, 68 %); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  14,8 ( $\text{SCH}_2\text{CH}_3$ ), 20,6, 20,7, 20,8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 25,6 ( $\text{SCH}_2\text{CH}_3$ ), 62,3, 62,9, 66,2, 69,0, 71,4 (C-2-6), 82,5 (C-1), 169,6, 170,0, 170,7 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**3,4-di-O-acetil-2-azido-6-O-(terc-butildimetilsilil)-2-desoxi-1-tio- $\alpha$ -D-manopiranosido de etilo (**23**)**. A una disolución de **22** (3,71 g, 9,88 mmoles) en MeOH (30 ml) se añadió NaOMe (1 M). La mezcla se neutralizó con AcOH después de 1 h y se concentró. El residuo seco se disolvió en piridina (15 ml) y se añadió cloruro de *terc*-butildimetilsililo (1,94 g, 12,87 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a ta durante la noche. La acetilación con anhídrido acético, dilución con tolueno, filtración (sílice), concentración y purificación por cromatografía (1:0  $\rightarrow$  1:1 de tolueno-EtOAc) dio **23** (4,357 g, 9,73 mmoles, 99 %);  $[\alpha]_{\text{D}} +109^\circ$  (c 1,0,  $\text{CHCl}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  -5,33, -5,28 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 14,7 ( $\text{SCH}_2\text{CH}_3$ ), 18,4 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 20,7, 20,9 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 25,0 ( $\text{SCH}_2\text{CH}_3$ ), 25,9 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 62,6, 62,9, 67,0, 71,7, 71,9 (C-2-6), 81,5 (C-1), 169,7, 170,1 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  0,05 (s, 3H), 0,05 (s, 3H), 0,90 (s, 9H), 1,30 (t, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,55-2,75 (m, 2H), 3,60-3,75 (m, 2H), 4,10 (m, 1H), 4,15-4,20 (m, 1H), 5,20-5,25 (m, 1H), 5,30-5,35 (m, 1H); HR-EM calcd para  $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{NaO}_6\text{SSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  470,1757, hallada 470,1750.



**3,4-di-O-acetil-2-azido-6-O-(terc-butildimetilsilil)-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido (26).** Se añadió NIS (394 mg, 1,75 mmoles) y AgOTf (cat) a una disolución de 23 (653 mg, 1,46 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> húmedo (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a -20 °C durante 30 min. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la mezcla se lavó con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 %), se filtró (sílice) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía (1:0  $\rightarrow$  1:1 de tolueno-EtOAc) dando 26 (487 mg, 1,21 mmoles, 82 %); RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  -5,29, -5,22 (CH<sub>3</sub>Si), 18,6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 20,7, 20,9 (CH<sub>3</sub>CO), 26,0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 62,1, 63,2, 66,9 71,0, 71,6 (C-2-6), 92,7 (C-1), 169,8, 170,3 (CH<sub>3</sub>CO); RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  0,05 (s, 3H), 0,06 (s, 3H), 0,89 (s, 9H), 2,03 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 3,65-3,70 (m, 2H), 4,00-4,02 (m, 2H), 5,19-5,23 (m, 2H), 5,42-5,47 (m, 1H).

**Hidrogenofosfonato de 3,4-di-O-acetil-2-azido-6-O-(terc-butildimetilsilil)-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilo, sal de trietilamonio (27).** Se agitó una mezcla de imidazol (915 mg, 13,45 mmoles),  $\text{PCl}_3$  (335  $\mu\text{l}$ , 3,84 mmoles) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (2,0 ml, 14,35 mmoles) en MeCN (25 ml) a 0 °C durante 30 min. Se añadió una disolución del compuesto 26 (388 mg, 0,96 mmoles) en MeCN (25 ml) durante 30 min a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó entonces a ta durante 10 min, se extinguió con TEAB (0,5 M) y se concentró. El residuo se diluyó ( $\text{CHCl}_3$ ), se lavó con TEAB (0,5M), se filtró (algodón) y se concentró. Cromatografía (1:0  $\rightarrow$  10:1 de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH+1,0 % de  $\text{Et}_3\text{N}$ ) del residuo dio 27 (499 mg, 0,93 mmoles, 97 %);  $[\alpha]_{\text{D}}^{+67}$  (c 1,0,  $\text{CHCl}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  -5,43, ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 8,98, 18,3 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 20,6, 20,8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 25,8 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 45,7, 62,4, 62,5, 66,5, 71,1, 72,1 (C-2-6), 93,1 (C-1), 169,4, 170,0 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  -0,06 (s, 3H), -0,05 (s, 3H), 0,79 (s, 9H), 1,94 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 3,59-3,63 (m, 2H), 3,93-4,00 (m, 2H), 5,21-5,28 (m, 1H), 5,37-5,41 (m, 1H), 5,51-5,50 (m, 1H); RMN  $^{31}\text{P}$   $\delta$  0,28; HR-EM calcd para  $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{PSi}$  [M] $^-$  466,1411, hallada 466,1400.

#### Ejemplo 7b

**3,4-Di-O-acetil-2-azido-6-O-(terc-butildimetilsilil)-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido d e 2-(benciloxicarbonil)aminoetil (24).** Se disolvió el compuesto 23 (527 g, 1,18 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) que contenía EM (4Å). Se añadió N-(2-hidroxietil)carbamato de bencilo (300 mg, 1,54 mmoles) y la mezcla se agitó bajo argón a -20 °C durante 30 min antes de añadir NIS (345 mg, 1,53 mmoles) y AgOTf (cat). Después de 30 min la mezcla de reacción se neutralizó con  $\text{Et}_3\text{N}$ , se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se lavó con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (10 %), se filtró (sílice) y se concentró. La cromatografía (1:0  $\rightarrow$  1:1 de tolueno-EtOAc) dio 24 (595 mg, 1,02 mmoles, 86 %);  $[\alpha]_{\text{D}}^{+46}$  (c 1,0,  $\text{CHCl}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  -5,38, -5,34 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 18,4 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 20,6, 20,8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 25,9 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 40,7 ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 61,6, 62,6, 66,6, 66,9, 67,6, 71,3, 71,8 (C-2-6,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 98,0 (C-1), 128,2, 128,3, 128,6, 136,5 (C aromático), 156,4 ( $\text{NHCOOCH}_2$ ), 169,6, 170,1 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  0,03 (s, 3H), 0,04 (s, 3H), 0,89 (s, 9H), 2,03 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,35 (s, 1H) 3,32 -3,40 (m, 1H), 3,44-3,52 (m, 1H), 3,58-3,66 (m, 3H), 3,72-3,80 (m, 2H), 3,98-4,00 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 5,18-5,23 (m, 1H), 5,32-5,36 (m, 1H), 7,16-7,36 (m, 5H).

**3,4-Di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido de 2-(benciloxicarbonil)aminoetil (25).** A una disolución del compuesto 24 (575 mg, 0,99 mmoles) en THF (5 ml) se añadió TREAT-HF (0,81 ml, 4,97 mmoles). La mezcla se agitó bajo argón a ta durante la noche. La concentración y cromatografía (2:1  $\rightarrow$  0:1 de tolueno-EtOAc) dio 25 (448 mg, 0,96 mmoles, 97 %);  $[\alpha]_{\text{D}}^{+60}$  (c 1,0,  $\text{CHCl}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  20,7, 20,8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 40,7 ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 61,4, 61,6, 66,4, 67,0, 67,5, 70,9, 71,0 (C-2-6,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 98,2 (C-1), 128,3, 128,3, 128,7, 136,5 (C aromático), 156,5 ( $\text{NHCOOBn}$ ), 170,1, 170,5 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  2,04 (s, 3H), 2,1 (s, 3H), 3,32-3,46 (m, 2H), 3,54-3,60 (m, 2H), 3,62-3,78 (m, 3H), 4,02-4,04 (m, 1H), 5,06-5,18 (m, 3H), 5,22-5,28 (m, 1H), 5,36-5,40 (m, 1H), 7,28-7,38 (m, 5H); HR-EM calcd para  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{NaO}_9[\text{M}+\text{Na}]^+$  489,1597, hallada 489,1574.

#### Ejemplo 7c

**Sal de trietilamonio de (3,4-di-O-acetil-2-azido-6-O-(terc-butildimetilsilil)-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-(benciloxicarbonil)aminoetil-3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (28).** Una mezcla de 25 (325 mg, 0,60 mmoles) y 27 (217 mg, 0,47 mmoles) se disolvió en piridina (3 ml). Se añadió cloruro de pivaloilo (144  $\mu\text{l}$ , 1,18 mmoles) y la mezcla se agitó bajo argón a ta durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió a -40 °C y se añadió una disolución de  $\text{I}_2$  (143 mg, 0,56 mmoles) en piridina- $\text{H}_2\text{O}$  (3 ml 49:1). La oxidación se completó a 0 °C y la mezcla se diluyó con  $\text{CHCl}_3$ , se lavó con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (10 %) y TEAB frío (0,5 M). La filtración (algodón), concentración y cromatografía (1:0  $\rightarrow$  10:1 de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH+0,5 % de  $\text{Et}_3\text{N}$ ) dio 28 (469 mg, 0,45 mmoles, 96 %);  $[\alpha]_{\text{D}}^{+52}$  (c 1,0,  $\text{CHCl}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  -5,48, -5,38 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 9,27,18,4 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 20,6, 20,7, 20,8, 20,8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 25,9 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 40,7 ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 45,8, 61,7, 62,2, 64,5, 66,3, 66,6, 66,7, 67,3, 69,8, 69,9, 71,2, 71,3, 71,8 (C-2-6, 2'-6',  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) 94,1, 97,9 (C-1, -1'), 128,1, 128,2, 128,6, 136,8 (C aromático), 156,7 ( $\text{NHCOOBn}$ ), 169,3, 169,7,170,0,170,1 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  0,00 (s, 3H), 0,02 (s, 3H), 0,88 (s, 9H), 1,98 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 3,30-3,38 (m, 1H), 3,42-3,52 (m, 1H), 3,56-3,64 (m, 1H), 3,66-3,68 (m, 2H), 3,74-3,80 (m, 1H), 3,90-4,04 (m, 5H), 4,12-4,14 (m, 1H), 5,1 (s, 2H), 2,16-2,22 (m, 1H), 5,29 (m, 1H), 5,32-5,47 (m, 3H), 5,51-5,54 (m, 1H), 5,63-5,68 (m, 1H), 7,28-7,38 (m, 5H); RMN  $^{31}\text{P}$   $\delta$  -3,61.

#### Ejemplo 7d

**Sal de trietilamonio de (3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-(benciloxicarbonil)aminoetil-3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (29).** Se disolvió el compuesto 28 (472 mg, 0,46 mmoles) en THF (10 ml) y se añadió TREAT-HF (372  $\mu\text{l}$ , 2,28 mmoles). La mezcla se agitó a ta durante 24 h, seguido de concentración y purificación sobre gel de sílice (1:0  $\rightarrow$  5:1 de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH+0,5 % de  $\text{Et}_3\text{N}$ ) dando 29 (390 mg, 0,42 mmoles, 91 %);  $[\alpha]_{\text{D}}^{+34}$  (c 1,0,  $\text{CHCl}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  10,6, 20,6, 20,8, 20,8, ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 40,7 ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 46,1, 61,5, 61,7, 62,2, 62,3, 64,6, 66,6, 66,6, 66,8, 67,4, 69,9, 70,0, 70,9, 71,2, 71,9, (C-2-6, 2'-6',  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 94,0, 98,0 (C-1, -1), 128,1, 128,2, 128,6, 136,6 (C aromático), 156,6 ( $\text{NHCOOBn}$ ), 169,9,170,3 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); RMN  $^{31}\text{P}$   $\delta$  -3,51; HR-EM calcd para  $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_{18}\text{P}$  [M] $^-$  816,2089, hallada 816,2078.

Los siguientes esquemas se aplican a los Ejemplos 8-12.



Ejemplo 7

Sal de bis-trietilamonio de (3,4-di-O-acetil-2-azido-6-O-(terc-butildimetilsilil)-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-(Benciloxicarbonil)aminoetil-3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (30). A una mezcla de 27 (273 mg, 0,51 mmoles) y 29 (357 mg, 0,39 mmoles) en piridina (3 ml) se añadió cloruro de pivaloilo (119  $\mu$ l, 0,97 mmoles). Después de 2 h la mezcla se enfrió a -40 °C y se añadió una disolución de I<sub>2</sub> (119 mg, 0,47 mmoles) en piridina-H<sub>2</sub>O (3 ml 49:1). La mezcla se diluyó con CHCl<sub>3</sub> cuando la temperatura alcanzó -10 °C. La extracción con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 %), TEAB frío (0,5 M), filtración (algodón) y cromatografía (1:0 $\rightarrow$  5:1 de CHCl<sub>3</sub>-MeOH+0,5 % de Et<sub>3</sub>N) dio 30 (351 mg, 0,24 mmoles, 62 %); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +68° (c 1,0, CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  -5,53, -5,42 (CH<sub>3</sub>Si), 10,1, 18,3 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 20,5, 20,6, 20,6, 20,8 (CH<sub>3</sub>CO), 25,9 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 40,6 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 45,9, 61,7, 62,1, 62,3, 64,2, 66,2, 66,4, 66,5, 67,1, 69,7, 70,4, 71,0, 71,2, 71,4, 71,6, 77,4 (C-2-6, 2'-6', 2''-6'', PhCH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 93,8, 94,0, 97,8 (C-1, -1', -1''), 128,0, 128,2, 128,5, 136,9 (C aromático), 156,8 (NHCOOBn), 169,3, 169,6, 169,7, 169,8, 169,9, 170,0 (CH<sub>3</sub>CO); RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  -0,05 (s, 3H), -0,03 (s, 3H), 0,80 (s, 9H), 1,90-2,00 (m, 18H), 3,23- 3,31 (m, 1H), 3,36-3,45 (m, 1H), 3,50-3,64 (m, 4H), 3,69-3,76 (m, 1H), 3,79-3,97 (m, 7H), 4,02-4,15 (m, 3H), 5,00-5,06 (m, 2H), 5,12-5,21 (m, 2H), 5,24-5,31 (m, 1H), 5,33-5,37 (m, 2H), 5,38-5,45 (m, 3H), 6,04-6,10 (m, 1H), 7,18-7,30 (m, 5H); RMN <sup>31</sup>P  $\delta$  -3,89, -3,56; HR-EM calcd para C<sub>46</sub>H<sub>66</sub>N<sub>10</sub>NaO<sub>27</sub>P<sub>2</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 1303,3241, hallada 1303,3197.

Ejemplo 8

Sal de bis-trietilamonio de (2-acetamido-3,4-di-O-acetil-6-O-(terc-butildimetilsilil)-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-(benciloxicarbonil)aminoetil-2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (31). Se disolvió el compuesto 30 (83 mg, 0,056 mmoles) en MeOH (3 ml) y se añadió NiCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> (cat). la reducción se realizó añadiendo NaBH<sub>4</sub> en pequeñas cantidades durante un periodo de 1 h a 0 °C. A continuación, la mezcla se sometió a anhídrido acético, seguido de dilución (MeOH) y concentración. El residuo se purificó sobre gel de sílice (1:0 $\rightarrow$  5:1 de CHCl<sub>3</sub>-MeOH+0,5 % de Et<sub>3</sub>N) y sobre gel de LH-20 (MeOH+1,5 % de Et<sub>3</sub>N) dando el compuesto 31 (76 mg, 0,050 mmoles, 89 %); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +63° (c 1,0, CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  -5,44, -5,38 (CH<sub>3</sub>Si), 8,46, 18,4 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 20,9, 21,0, 21,0, 21,1, 23,0, 23,0, 23,0, 23,3, 23,9 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH), 26,0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 40,8 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 46,1, 50,1, 50,4, 50,7 (C-2, -2', -2''), 59,1, 61,6, 64,5, 65,0, 65,7, 65,9, 66,7, 67,1, 70,0, 70,2, 70,3, 71,3, 77,4 (C-3-6, 3'-6', 3''-6'', PhCH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 94,9, 95,1, 99,1 (C-1, -1', -1''), 128,0, 128,1, 128,6, 136,8 (C aromático), 156,6 (NHCOOBn), 169,5, 169,6, 170,0, 170,5, 170,6, 170,8, 171,3 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH); RMN <sup>31</sup>P  $\delta$  -3,75, -3,39; HR-EM calcd para C<sub>52</sub>H<sub>79</sub>N<sub>4</sub>O<sub>30</sub>P<sub>2</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 1329,4024, hallada 1329,3984.

Ejemplo 9

Sal de bis-trietilamonio de 2-aminoetil-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-6-O-(terc-butildimetilsilil)-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil fosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil fosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (32). A una disolución del compuesto 31 (37 mg, 0,024 mmoles) en MeOH (1,5 ml) se añadió la resina Amberlite IR -45(OH) (40 mg) y paladio sobre carbono activo. La mezcla se hidrogenolisó a 100 psi durante la noche, se diluyó (MeOH), se centrifugó y se concentró. La purificación sobre gel de fase inversa (1:0 $\rightarrow$  0:1 de H<sub>2</sub>O-MeOH) dio 32 (28 mg, 0,020 mmoles, 83 %); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +60° (c 1,0, MeOH); RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  -5,9, -5,4 (CH<sub>3</sub>Si), 8,89, 18,7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 20,9, 21,0, 22,4, 22,5 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH), 26,0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 39,7 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 47,3, 50,6, 51,4 (C-2, -2', -2''), 62,4, 64,4, 64,7, 64,9, 65,9, 66,2, 66,6, 70,1, 70,8, 71,0, 71,2, 71,5 (C-3-6, 3'-6', 3''-6'', OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 95,4, 95,5, 99,1 (C-1, -1', -1''), 173,1, 173,3, 173,5, 173,6, 173,8, 174,9, 175,1, 175,2 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH); RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  -3,04, -2,87; HR-EM calcd para C<sub>44</sub>H<sub>72</sub>N<sub>4</sub>O<sub>28</sub>P<sub>2</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> 1195,3656, hallada 1195,3567.

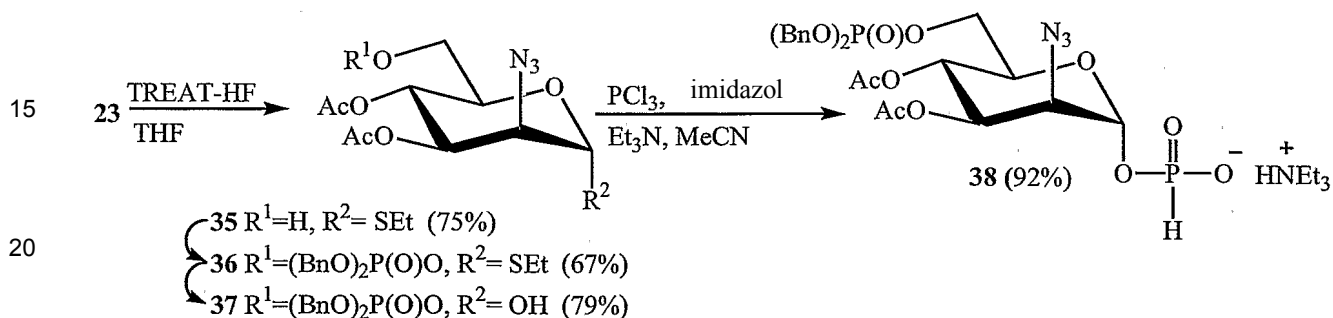
Ejemplo 10

Sal de bis-trietilamonio de 2-aminoetil-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil fosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (33). Una disolución de TREAT-HF (17  $\mu$ l, 0,10 mmoles) en THF (1,5 ml) se trató con Et<sub>3</sub>N (17  $\mu$ l, 0,12 mmoles). Esta disolución se añadió al compuesto 32 (28 mg, 0,020 mmoles). Después de 30 minutos de agitación a ta la mezcla se concentró y se purificó sobre gel de fase inversa (1:0 $\rightarrow$  0:1 de H<sub>2</sub>O-MeOH) que dio 33 (22 mg, 0,017 mmoles, 85 %); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +45° (c 1,0, MeOH); RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8,87, 20,9, 20,9, 22,3, 22,4 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH), 39,6 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 47,3, 50,6, 51,3, 51,4 (C-2, -2', -2''), 60,2, 64,3, 64,5, 64,9, 66,2, 66,4, 69,9, 70,0, 70,5, 70,5, 70,7, 70,8, 71,0, 71,6 (C-3-6, 3'-6', 3''-6'', OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 95,3, 95,3, 99,5 (C-1, -1', -1''), 173,3, 173,3, 173,6, 173,7, 173,8, 175,0, 175,1, 175,3 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH); RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  (D<sub>2</sub>O) 2,03 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 3,28-3,36 (m, 2H), 3,68-3,84 (m, 3H), 4,00-4,18 (m, 5H), 4,27-4,33 (m, 1H), 4,57-4,64 (m, 2H), 5,22-5,30 (m, 1H), 5,31-5,37 (m, 2H), 5,44-5,49 (m, 1H); RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  -3,02, -2,95; HR-EM calcd para C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>28</sub>P<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1103,261, hallada 1103,2642.

Ejemplo 11

**Sal de bis-trietilamonio de 2-aminoetil-(2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil fosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (34).** El compuesto 33 (22 mg, 0,017 mmoles) se disolvió en MeOH (1 ml) y se añadió NaOMe (1M). La mezcla se concentró después de 30 min y el residuo se purificó sobre gel de fase inversa (H<sub>2</sub>O $\rightarrow$  MeOH). Las fracciones que contienen el producto se liofilizaron dando 34 (14 mg, 0,016 mmoles, 94 %);  $[\alpha]_D +12,4^\circ$  (c 0,5, MeOH); RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  22,6 (CH<sub>3</sub>CONH), 40,1 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 53,1, 53,8, 53,9 (C-2, -2', -2''), 60,8, 65,3, 66,6, 67,0, 69,1, 69,3, 69,5, 72,2, 73,0, 74,1 (C-3-6, 3'-6', 3''-6'', OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 95,8, 95,8, 99,6 (C-1, -1', -1''), 175,5, 175, 5, 175,6 (CH<sub>3</sub>CONH); RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  -2,36, -2,22; HR-EM calcd para C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>22</sub>P<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 829,2157, hallada 829,2064.

### 10 Ejemplo 13a



25 **3,4-Di-O-acetil-2-azido-2-desoxi-1-tio- $\alpha$ -D-manopiranosido de etilo (35).** Al compuesto 23 (305 mg, 0,68 mmoles) disuelto en THF (6 ml) se añadió TREAT-HF (0,55 ml, 3,38 mmoles). La mezcla se agitó a ta durante la noche. La concentración y cromatografía (10:1 $\rightarrow$  0:1 de tolueno-EtOAc) dio **35** (171 mg, 0,51 mmoles, 75 %); RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  14,7 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20,6, 20,8 (CH<sub>3</sub>CO), 25,4 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61,3, 63,0, 66,6, 71,1, 71,3 (C-2-6), 82,2 (C-1), 170,0, 170,6 (CH<sub>3</sub>CO); RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  1,26-1,30 (t, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,32 (s, 1H), 2,56-2,68 (m, 2H), 3,58-3,67 (m, 2H), 4,09-4,14 (m, 2H), 5,24-5,35 (m, 3H).

### Ejemplo 13b

35 **3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi-6-O-dibencilfosfato-1-tio- $\alpha$ -D-manopiranosido de etilo (36).** Al compuesto **35** (171 mg, 0,51 mmoles) disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) se añadió tetrazol (125 mg, 1,78 mmoles) y *N,N*-diisopropilfosforamido (264  $\mu$ l, 0,76 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a ta. Se añadió *m*-CPBA (176 mg, 1,02 mmoles) a 0 °C y la agitación continuó durante 30 min. La mezcla se diluyó (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), se lavó con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 %) y NaHCO<sub>3</sub>. La filtración (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), concentración y cromatografía (10:1 $\rightarrow$  2:1 de tolueno-EtOAc) dio **36** (200 mg, 0,34 mmoles, 67 %);  $[\alpha]_D +92^\circ$  (c 1,0, CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  14,6 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20,5, 20,6 (CH<sub>3</sub>CO), 25,3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 62,9, 65,7, 66,1, 69,4, 69,4, 69,5, 71,4, (C-2-6, PhCH<sub>2</sub>O), 82,0 (C-1), 127,9, 128,0, 128,5, 128,5, 128,6, 128,6, 128,7, 135,8, 135,9 (C aromático), 169,5, 169,9 (CH<sub>3</sub>CO); RMN <sup>31</sup>P  $\delta$  -1,36; HR-EM calcd para C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>9</sub>PS [M+Na]<sup>+</sup> 616,1495, hallada 616,1487.

### Ejemplo 13c

45 **3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi-6-O-dibencilfosfato- $\alpha$ -D-manopiranosido (37).** Se disolvió el compuesto **36** (281 mg, 0,47 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> húmedo (10 ml) y se enfrió a -20 °C. Se añadió NIS (137 mg, 0,61 mmoles) y AgOTf (cat) y la mezcla se agitó durante 30 min a -20 °C. La mezcla se diluyó (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), se lavó con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 %), se filtró (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. La cromatografía (2:1 $\rightarrow$  0:1 de tolueno-EtOAc) dio **17** (201 mg, 0,37 mmoles, 79 %); RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  20,7, 20,7, 62,5, 66,2, 66,3, 66,4, 68,6, 68,7, 69,6, 69,7, 69,8, 69,8, 71,0 (C-2-6, PhCH<sub>2</sub>O), 92,5 (C-1), 128,0, 128,1, 128,3, 128,6, 128,7, 128,7, 135,6, 135,7 (C aromático), 169,8, 170,1 (CH<sub>3</sub>CO); RMN <sup>31</sup>P  $\delta$  -1,87.

### Ejemplo 13d

55 **3,4-Di-O-acetil-2-azido-2-desoxi-6-O-dibencilfosfato- $\alpha$ -D-manopiranosil-hidrogenofosfonato, sal de trietilamonio (38).** Una mezcla de imidazol (349 mg, 5,13 mmoles), PCl<sub>3</sub> (128  $\mu$ l, 1,47 mmoles) y Et<sub>3</sub>N (765  $\mu$ l, 5,49 mmoles) en MeCN (10 ml) se agitó a 0 °C durante 30 min. Se añadió una disolución del compuesto **37** (201 mg, 0,37 mmoles) en MeCN (10 ml) durante 30 min a 0 °C. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a ta durante 10 min, se extinguió con TEAB (0,5 M) y se concentró. El residuo se diluyó (CHCl<sub>3</sub>), se lavó con TEAB (0,5 M), se filtró (algodón) y se concentró. La cromatografía (1:0 $\rightarrow$  10:1 de CHCl<sub>3</sub>-MeOH+1,0 % de Et<sub>3</sub>N) del residuo dio **38** (243 mg, 0,34 mmoles, 92 %);  $[\alpha]_D +55^\circ$  (c 1,0, CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  9,34, 20,6, 20,7 (CH<sub>3</sub>CO), 45,9, 62,4, 62,5, 65,6, 65,7, 69,4, 69,5, 69,9, 70,0, 70,9 (C-2-6, PhCH<sub>2</sub>O), 93,0 (C-1), 128,0, 128,0, 128,1, 128,5, 128,5, 128,6, 135,8 (C aromático), 169,5, 169,9 (CH<sub>3</sub>CO); RMN <sup>31</sup>P  $\delta$  -1,32, 0,29; HR-EM calcd para C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>P<sub>2</sub> [M]<sup>-</sup> 612,1148, hallada 612,1129.

65 El siguiente esquema se aplica a los Ejemplos 13e y 14-17.





Ejemplo 13e

5 **Sal de bis-trietilamonio de (3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi-6-O-dibencilfosfato- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato) de 2-(benciloxicarbonil)aminoetilo-(1 $\rightarrow$ 6)-(3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (39).** Se disolvió una mezcla de **38** (96 mg, 0,13 mmoles) y 29 (103 mg, 0,11 mmoles) en piridina (3 ml). Se añadió cloruro de pivaloilo (34  $\mu$ l, 0,28 mmoles) y la mezcla se agitó bajo argón a ta durante 2 h. La mezcla se enfrió a -40 °C y se añadió una disolución de I<sub>2</sub> (34 mg, 0,13 mmoles) en piridina-H<sub>2</sub>O (3 ml 49:1). La oxidación se completó a -10 °C y la mezcla se diluyó con CHCl<sub>3</sub>, se lavó con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 %) y TEAB frío (0,5 M). La filtración (algodón), concentración y cromatografía (1:0 $\rightarrow$  5:1 de CHCl<sub>3</sub>-MeOH+0,5 % de Et<sub>3</sub>N) dio **39** (106 mg, 0,065 mmoles, 59 %); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>+80° (c 1,0, CHCl<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  10,2, 20,6, 20,7, 20,8 (CH<sub>3</sub>CO), 40,6 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 45,9, 57,9, 61,7, 62,3, 64,4, 65,5, 65,7, 66,1, 66,5, 66,6, 67,2, 69,4, 69,5, 70,3, 71,0, 71,4 (C-2-6, 2'-6', 2"-6", PhCH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 93,9, 94,0, 97,8 (C-1, -1', -1"), 128,0, 128,1, 128,2, 128,5, 128,6, 136,0, 136,9 (C aromático), 156,8 (NHCOOBn), 169,6, 169,7, 169,8, 169,9 (CH<sub>3</sub>CO); RMN <sup>31</sup>P  $\delta$  -4,13, -3,58, -1,52.

Ejemplo 12

20 **Sal de bis-trietilamonio de (2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi-6-O-dibencilfosfato- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato) de 2-(benciloxicarbonil)aminoetilo-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil fosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (40).** Se disolvió el compuesto **39** (76 mg, 0,047 mmoles) en MeOH (3 ml) y se añadió NiCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> (cat). La reducción se realizó añadiendo NaBH<sub>4</sub> en pequeñas cantidades durante un periodo de 30 min a 0 °C. A continuación, la mezcla se sometió a anhídrido acético seguido de dilución (MeOH) y concentración. El residuo se purificó sobre gel de sílice (1:0 $\rightarrow$  5:1 de CHCl<sub>3</sub>-MeOH+0,5 % de Et<sub>3</sub>N) y sobre gel LH-20 (MeOH+1,5 % de Et<sub>3</sub>N), dando el compuesto **40** (50 mg, 0,030 mmoles, 64 %); RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8,89, 20,7, 20,8, 22,4 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH), 40,7 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 47,3, 50,7, 51,4 (C-2, -2', -2"), 64,5, 65,9, 66,1, 66,5, 66,6, 67,2, 67,3, 69,7, 69,8, 70,5, 70,8, 70,9, 71,1 (C-3-6, 3'-6', 3"-6", PhCH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 95,2, 95,3, 98,8 (C-1, -1', -1"), 128,2, 128,9, 129,0, 129,3, 129,5, 129,7, 135,7, 135,8, 137,1 (C aromático), 158,7 (NHCOOBn), 172,8, 172,9, 173,2, 173,3, 173,4, 173,4, 174,8, 174,9, 175,0 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH); RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  -3,05, -2,75, -1,20.

Ejemplo 13

35 **Sal de tris-trietilamonio de 2-aminoetil-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi-6-O-fosfato- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (41).** A una disolución del compuesto **40** (46 mg, 0,027 mmoles) en MeOH (2 ml) se añadió la resina Amberlite IR -45(OH) (46 mg) y paladio sobre carbono activo. La mezcla se hidrogenó a 100 psi durante la noche, se diluyó (MeOH), se centrifugó y se concentró. La purificación sobre gel de fase inversa (1:0 $\rightarrow$  0:1 de H<sub>2</sub>O-MeOH) dio **41** (34 mg, 0,023 mmoles, 85 %); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +43° (c 1,0, MeOH); RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8,89, 20,9, 20,9, 22,4, 22,4 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH), 39,6, (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 47,3, 50,6, 51,3, 51,4 (C-2, -2', -2"), 63,6, 64,4, 64,8, 66,1, 66,2, 66,4, 69,9, 70,0, 70,6, 70,7, 71,0 (C-3-6, 3'-6', 3"-6", OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 95,3, 95,4, 99,1 (C-1, -1', -1"), 173,2, 173,3, 173,4, 173,6, 173,7, 173,7, 175,0, 175,1, 175,2 (CH<sub>3</sub>CO, CH<sub>3</sub>CONH); RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  -3,08, -2,95, 0,05; HR-EM calcd para C<sub>38</sub>H<sub>59</sub>N<sub>4</sub>O<sub>31</sub>P<sub>3</sub>[M/2+H]<sup>+</sup> 580,1188, hallada 580,1142.

Ejemplo 14

50 **Sal de bis-sodio de (2-acetamido-2-azido-2-desoxi-6-O-dibencilfosfato- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato) de 2-(benciloxicarbonil)aminoetilo-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (42).** Se disolvió el compuesto **40** (50 mg, 0,030 mmoles) en MeOH (3 ml) y se añadió NaOMe (1M). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a ta. La concentración y purificación sobre gel de fase inversa (1:0 $\rightarrow$  0:1 de H<sub>2</sub>O-MeOH) dio **42** (30 mg, 0,024 mmoles, 80 %); RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  22,6 (CH<sub>3</sub>CONH), 40,7 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 53,1, 53,8, 54,0 (C-2, -2', -2"), 65,1, 66,4, 66,5, 66,8, 67,5, 68,9, 69,1, 69,6, 71,0, 71,1, 71,9, 72,0, 72,3, 73,1 (C-3-6, 3'-6', 3"-6", PhCH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 95,6, 95,8, 99,4 (C-1, -1', -1"), 128,1, 128,4, 129,0, 129,0, 129,4, 129,5, 129,8, 135,7, 135,8, 137,1 (C aromático), 158,8 (NHCOOBn), 175,3 (CH<sub>3</sub>CONH); RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  -2,35, -2,23, -0,96.

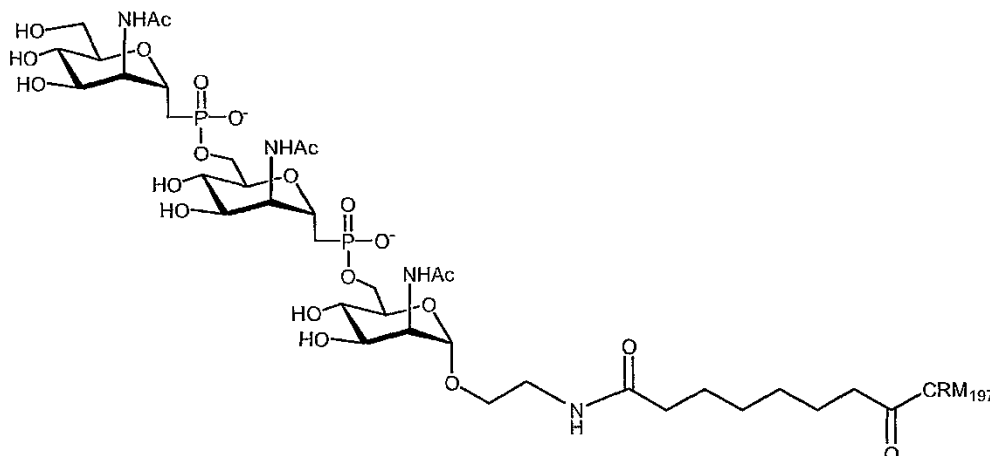
Ejemplo 15

60 **Sal de tris-sodio de 2-aminoetil-(2-acetamido-2-azido-2-desoxi-6-O-fosfato- $\alpha$ -D-manopiranosilfosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosil fosfato)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-acetamido-2-azido-2-desoxi- $\alpha$ -D-manopiranosido) (43).** Se disolvió el compuesto **42** (30 mg, 0,024 mmoles) en MeOH (2 ml). Se añadieron resina Amberlite IR - 45(OH) (30 mg) y paladio sobre carbono activo. La mezcla se hidrogenó a 100 psi durante la noche, se diluyó (MeOH), se centrifugó y se concentró. La purificación sobre gel de fase inversa (1:0 $\rightarrow$  0:1 de H<sub>2</sub>O-MeOH) dio **43** (15 mg, 0,015 mmoles, 64 %); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +13,6° (c 0,5, MeOH); RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  22,6, 22,6, 22,6 (CH<sub>3</sub>CONH), 39,7 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 49,5, 53,0, 53,7, 53,8 (C-2, -2', -2"), 63,8, 64,2, 65,1, 65,2, 65,4, 66,5, 66,7, 67,0, 68,9, 69,2, 69,5, 72,2, 72,3, 72,9, 73,1, 73,2, 73,4, 73,4 (C-3-6, 3'-6', 3"-6", OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 95,9, 99,6 (C-1, -1', -1"),

175,4, 175,5, 175,5 (CH<sub>3</sub>CONH); RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O) δ -2,35, -2,30, 2,2; HR-EM calcd para C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>25</sub>P<sub>3</sub> [M+2Na]<sup>-</sup> 953,1459, hallada 953,1440.

### Ejemplo 16

Para estudiar la influencia de C-fosfonato en lugar de fosfodiéster sobre la inmunogenicidad y estabilidad del sacárido MenA, se sintetizó un oligosacárido sintético análogo a trimeros de la unidad de repetición del polisacárido del grupo A de *Neisseria meningitidis* y se conjugó con la proteína transportadora CRM197. El glucoconjugado se analizó con el fin de verificar las características fisicoquímicas e inmunogenicidad en ratones. La estructura del conjugado es la siguiente.



Este compuesto se obtuvo reemplazando los grupos fosfodiéster que ligan los monosacáridos con un grupo C-fosfonato en la molécula de base no acetilada y no fosforilada.

#### a) Caracterización fisicoquímica de glucoconjugados de CRM-MenAsynth

El conjugado se caracterizó para el contenido de sacárido, proteínas, sacárido no unido (libre). Además, se realizaron SDS-PAGE y transferencia Western contra anticuerpos anti-MenA específicos.

#### Concentraciones de sacárido y de proteína

El producto liofilizado se reconstituyó con solución salina (concentración final = 0,8 mg/ml) y se ensayó por prueba colorimétrica para fósforo total y contenido de proteína (ensayo MicroBCA). A continuación, el contenido de fósforo se convirtió en contenido de sacárido total usando el factor de conversión apropiado.

Debido a que se generó algo de precipitado durante el almacenamiento del conjugado, se añadió un tampón fosfato concentrado (fosfato de Na 100 mM a pH 7,5) para alcanzar 10 mM como concentración final. A continuación, la concentración se recalculó considerando el factor de dilución. Los conjugados tuvieron un contenido de sacárido total de 97,10 µg/ml y contenido de proteína de 215,63 µg/ml después de la dilución con tampón fosfato.

#### b) Inmunogenicidad en ratones

La inmunogenicidad del conjugado con el oligosacárido sintético se analizó en ELISA y ensayos bactericidas. Se inmunizaron ratones BALB/c (8/grupo) con los glucoconjugados purificados formulados con y sin fosfato de alumbre como adyuvante. El protocolo de inmunización, mostrado en la Tabla 1, incluyó tres dosis (200 ng cada una) en los días 0, 14 y 28 con un sangrado final en el día 42. Los sueros después de 1, después de 2 y después de 3 dosis se analizaron para determinar IgG total específica y la actividad funcional del anticuerpo correspondiente. MenA-CRM 2011 es el conjugado de MenA no mutado.

**Tabla 1: Esquema de grupos de inmunización y pauta de tratamiento**

Vacuna	Nº Dosis	Dilución	Dosis (µg)	Formula	Nº Ratones	Administr.
MenA-CRM fosfonato conj.	3	1/5	0.2	AIPO <sub>4</sub>	33-40	0.5 ml s.c.
MenA-CRM fosfonato conj.	3	1/5	0.2	NO AIPO <sub>4</sub>	73-80	0.5 ml s.c.
MenA-CRM 2011	3	1/5	0.2	AIPO <sub>4</sub>	81-88	0.5 ml s.c.
MenA-CRM 2011	3	1/5	0.2	NO AIPO <sub>4</sub>	89-96	0.5 ml s.c.

Ensayo de ELISA

5 Se analizaron sueros en ensayo de ELISA para la determinación específica de respuestas de anticuerpos IgG en sueros de ratones. Se calcularon títulos de IgG totales contra los antígenos de polisacárido A, C, W135 e Y (MenA, MenC, MenW, MenY) por curvas de regresión lineal y se expresaron como unidades de ELISA/ml (UE/ml). Los títulos de suero resultaron de la comparación con la curva de valoración de un suero estándar.

10 Se recubrieron placas de microtitulación con una mezcla de polisacárido capsular y albúmina de suero humano metilada a una concentración final de 5,0 µg/ml cada una, en PBS a pH 7,4. Las placas se taparon, se incubaron durante la noche a 2 °-8 °C, a continuación se lavaron y se saturaron con un tampón que contenía 5 % de suero bovino fetal, como reactivo de bloqueo, en PBS a pH 7,4. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron y los sueros de prueba diluidos se añadieron a pocillos en la fila 1. Los sueros se analizaron por una curva de valoración con una etapa de dilución de dos veces. Después de la incubación durante la noche a 2 °-8 °C, las placas se lavaron y un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina se diluyó 1:2000 en tampón de saturación y se añadió a las placas. El anticuerpo secundario se incubó durante 2 horas a 37 °C y, después de lavar, a las placas se añadió disolución de sustrato cromogénico (1 mg/ml de fosfato de p-nitrofenilo en tampón dietanolamina 1 M a pH 9,8, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, 0,02 % de NaN<sub>3</sub>). Las reacciones se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y se leyeron valores de absorbancia a 405-620 nm de longitud de onda.

20 Los sueros con valores de absorbancia del primer punto superiores a los del patrón se volvieron a probar usando una dilución inicial mayor.

25 Ratones con respuesta de anticuerpos negativa (valores de D.O. del primer punto inferior a 0,300 a dilución 1:100) se asignaron a un título de 2 UE/ml y se clasificaron como "que no responden al tratamiento".

Ensayo de anticuerpo bactericida del suero (SBA)

30 Se analizaron anticuerpos funcionales inducidos por inmunizaciones con vacuna midiendo la lisis mediada por el complemento *in vitro* de *Neisseria meningitidis* (Goldschneider y col., 1969). Se usó un lote comercial de complemento de conejo bebé como fuente de complemento (lote de Pelfreeze n° 09958).

35 El protocolo del ensayo se basó en el inóculo de la cepa de prueba en caldo de Mueller Hinton (Difco) con la adición de 0,25 % de glucosa, a partir de colonias aisladas cultivadas sobre agar chocolate. El cultivo bacteriano se incubó a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y el crecimiento se detuvo cuando las bacterias alcanzaron la fase exponencial temprana (D.O.<sub>600</sub> 0,220-0,240). El cultivo se diluyó a 10<sup>4</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en disolución salina equilibradas con Gey con 1 % de BSA y se incubó durante 1 hora a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, en presencia de conjuntos de suero de prueba inactivados con calor y complemento de conejo bebé. Antes (T0) y una hora después (T1) de la incubación, las mezclas de reacción se sembraron en placa sobre agar de Mueller Hinton (Difco). Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y se contaron UFC/ml correspondientes a T0 y T1.

40 Los títulos de anticuerpo bactericidas del suero se expresaron como dilución del suero recíproca dando 50 % de destrucción de bacterias.

45 ResultadosCaracterización fisicoquímica

50 Los resultados de los análisis fisicoquímicos indican que el grado de glucosilación del conjugado es muy bajo. El grado de baja conjugación se indica también por las modestas señales obtenidas en transferencia Western y por las pequeñas diferencias notadas en SDS-PAGE entre los conjugados y la referencia de CRM. Pueden optimizarse las condiciones de conjugación, además de la purificación de los conjugados.

Resultados de ELISA

55 Los resultados obtenidos se informan en la Tabla 2 y la Figura 4. Se midieron títulos de ELISA de cada animal individual y se expresan en unidad de ELISA/ml (UE/ml). La respuesta del anticuerpo específico a cada glucoconjugado se calculó como el título medio geométrico (GMT) del grupo de inmunización correspondiente.

60 Los sueros después de 2 dosis mostraron bajo título en el conjugado sintético formulado con el adyuvante y cualquier título en grupos de inmunización tratados sin el adyuvante.

El conjugado no mostró ningún título con y sin alumbre.

65 Como era de esperar, los grupos de control tratados con y sin el adyuvante mostraron altas respuestas.

**Tabla 2. Títulos de anticuerpos de ELISA contra el polisacárido MenA determinados en sueros de ratones después de 1, después de 2 y después de 3 dosis. Se informa el título medio geométrico calculado para cada grupo de inmunización.**

		Despues de 1	Despues de 2	Despues de 3
-	Fosfonato conjugado	2	2	2
+	Fosfonato conjugado/AIPO <sub>4</sub>	23	36	17
MenA Iyo –	MenA-CRM	7	110	672
MenA Iyo +	MenA-CRM/AIPO <sub>4</sub>	3	453	1796

#### Resultados del ensayo SBA<sub>b</sub>

Se determinaron títulos bactericidas de sueros en conjuntos de sueros preparados a partir de cada grupo de inmunización. El título bactericida se expresa como la dilución en suero recíproca que produce el 50 % de disminución en UFC/ml de mezclas de reacción en comparación con las UFC de control/ml medidas en T0. Se midieron títulos bactericidas contra la cepa F8238 del serogrupo A. Los títulos de anticuerpos SBA<sub>b</sub> se informan en la Tabla 3. (MenA-CRM es el control no mutado.)

**Tabla 3. Actividad bactericida en conjuntos de suero después de 2 y después de 3 dosis.**

		Despues de 2	Despues de 3
-	Fosfonato conjugado	<4	<4
+	Fosfonato conjugado/AIPO <sub>4</sub>	64	256
MenA Iyo –	MenA-CRM	2048	4096
MenA Iyo +	MenA-CRM/AIPO <sub>4</sub>	4096	8192

#### Conclusiones

El conjugado se preparó y analizó para propiedades fisicoquímicas, inmunoquímicas e inmunológicas.

Tanto los análisis fisicoquímicos como inmunoquímicos indicaron los grados de glucosilación de los conjugados.

En grupos de control, los títulos fueron altos en respuesta a inmunizaciones tanto con como sin el adyuvante.

En los conjuntos de sueros después de 3, los títulos aumentaron en comparación con sueros después de 2 dosis. En grupos tratados con el conjugado sintético sin alumbre, los títulos no fueron medibles; en inmunizaciones con el conjugado adyuvantado los títulos fueron medibles, pero menores.

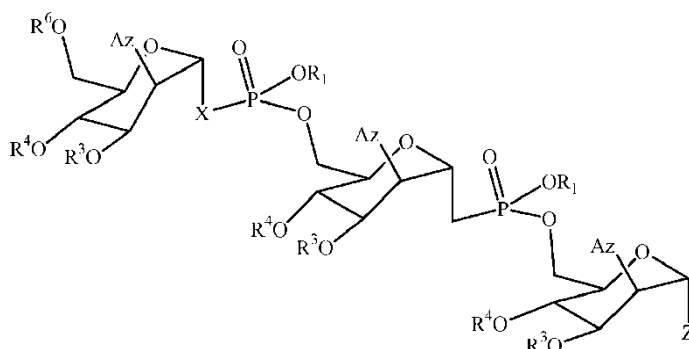
Los títulos de inmunizaciones de control realizadas con el oligoconjugado fueron significativamente mayores.

Los resultados dan evidencia de que el oligosacárido MenA sintético conjugado con el transportador de proteína CRM197 es inmunogénico en ratones. Los conjugados tienen enlaces C-fosfonato que deben ser mucho más estables que los enlaces fosfodiéster nativo. El hecho de que se haya detectado alguna inmunogenicidad es prometedor.

Se apreciará que los anteriores ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención. Diversas variaciones y combinaciones de los elementos desvelados son viables como reconocería un experto habitual. Por ejemplo, son muy conocidos una amplia matriz de grupos protectores para grupos amina e hidroxilo, y muchos de estos pueden usarse en lugar de los específicamente citados en el presente documento.

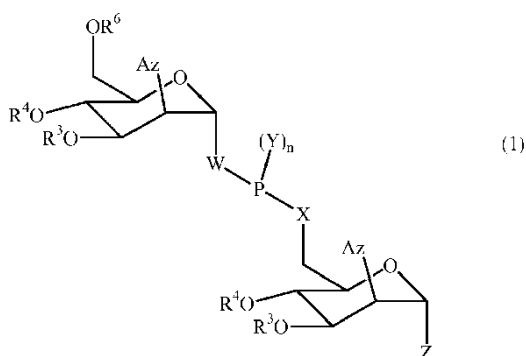
**Reivindicaciones**

1. Un oligosacárido que comprende una primera unidad de manosa y una segunda unidad de manosa,  
 5 en el que la primera unidad de manosa comprende un resto de espaciador en la configuración alfa en C-1, espaciador que puede conjugarse con una proteína,  
 en el que la primera unidad de manosa está conectada a la segunda unidad de manosa mediante un enlace 1,6 que conecta C-6 de la primera unidad con C-1 de la segunda unidad,  
 y en el que el enlace 1,6 comprende un fosfonato.  
 10 2. El oligosacárido de la reivindicación 1, en el que el enlace 1,6 está en la configuración alfa.  
 3. El oligosacárido de la reivindicación 1 ó 2, en el que la primera unidad de manosa es un derivado de manosa sustituido con 2-desoxi-2-aza.  
 15 4. El oligosacárido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la segunda unidad de manosa es un derivado de manosa sustituido con 2-desoxi-2-aza.  
 5. El oligosacárido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que cada sustituyente 2-aza presente está seleccionado de NH<sub>2</sub>, NHAc y N<sub>3</sub>.  
 20 6. El oligosacárido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que una tercera unidad de manosa está conectada a la segunda unidad de manosa por un enlace que comprende fósforo, y en el que el enlace conecta C-6 de la segunda unidad de manosa con C-1 de la tercera unidad de manosa.  
 25 7. El oligosacárido de la reivindicación 6, que es de fórmula:



- 30 en la que cada Az está seleccionado independientemente de NH<sub>2</sub>, NHAc y N<sub>3</sub>;  
 Z representa el resto de espaciador que puede conjugarse con una proteína, y que puede estar en forma protegida o no protegida o que puede conjugarse con una proteína;  
 35 cada R<sup>1</sup> es independientemente H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido, o M, en la que M representa un catión;  
 X es O o CH<sub>2</sub>;  
 40 cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> está seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, Ac, Bn, y otro grupo protector;  
 y R<sup>6</sup> es H, o un grupo protector, o un fosfato, o un enlace con una unidad de sacárido adicional.  
 45 8. El oligosacárido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además una proteína que está conjugada con el oligosacárido mediante el resto de espaciador que está en la configuración alfa en C-1 de la primera unidad de manosa; en el que la proteína es una toxina bacteriana inactivada seleccionada de toxoide diftérico, toxoide de pertussis, LT de *E. coli*, ST de *E. coli*, exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) o toxoide tetánico, o en el que la proteína es CRM197.  
 55 9. El oligosacárido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que R<sup>3</sup> es un grupo acilo y R<sup>4</sup> es H.  
 60 10. El oligosacárido de la reivindicación 1, que comprende la fórmula:

65

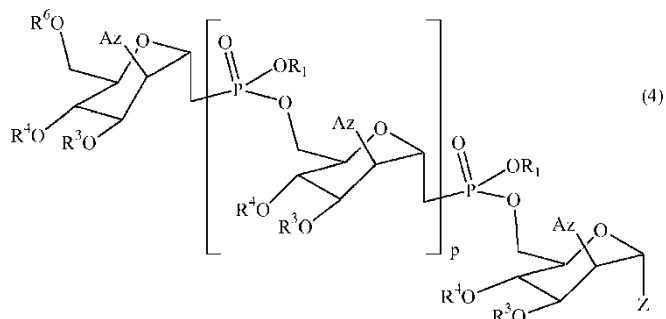


15 en la que cada Az representa un sustituyente aza;  
 cada  $R^3$  y  $R^4$  representa independientemente H o un grupo protector;  
 $R^6$  representa H, un grupo protector, o un conector unido a otra unidad de sacárido; uno de W y X es O, y el otro de W y X es  $CH_2$ ;  
 n es 2;  
 un Y es =O y el otro Y es OR,  
 en el que R es H, alquilo C1-C6, o arilo C6-C12, o aril C6-C12-alquilo, o R es M, en la que M es un catión; y  
 Z es  $OR'$ ,  $SR'$  o  $NR'_2$ , en las que cada  $R'$  es independientemente H o un grupo alquilo, acilo, arilo, arilalquilo, heteroalquilo, heteroacilo, heteroarilo o heteroarilalquilo opcionalmente sustituido;  
 o Z representa un conector unido a otra unidad de sacárido o el resto de espaciador conjugado con una proteína.

11. El oligosacárido de la reivindicación 10, en el que W es  $CH_2$ , X es O, Az es NHAc y n es 2.

12. El oligosacárido de la reivindicación 10 ó 11, en el que R es M y Z comprende  $-O-(CH_2)_n-NH-$ , en el que n es 2-6.

13. El oligosacárido de la reivindicación 1, que comprende la fórmula:

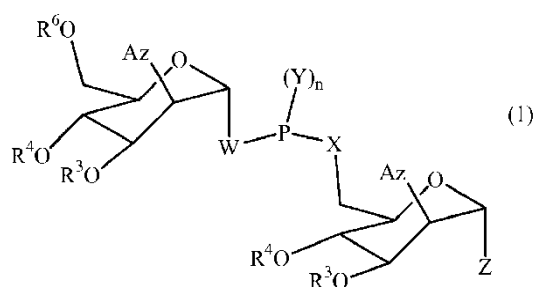


45 en la que cada Az representa un sustituyente aza;  
 $R^1$  es H, alquilo C1-C6, o arilo C6-C12, o aril C6-C12-alquilo, o  $R^1$  es M, en la que M es un catión;  
 cada  $R^3$  y  $R^4$  representa independientemente H o un grupo protector;  
 $R^6$  representa un acilo C1-C6 o H;  
 Z representa un resto de espaciador conjugado con una proteína; y en el que p es un número entero de 1 a 20;  
 que comprende además una proteína que está conjugada con el oligosacárido; en el que la proteína es una toxina bacteriana inactivada seleccionada de toxoide diftérico, toxoide de pertussis, LT de *E. coli*, ST de *E. coli*, exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), o toxoide tetánico.

55 14. Un método para preparar un oligosacárido, método que comprende:

ligar un primer resto que comprende al menos una unidad de manosa sustituida con aza mediante un enlace 1,6 que comprende un fosfonato con un segundo resto que comprende al menos una unidad de manosa sustituida con aza,  
 en el que el primer resto comprende un resto de espaciador, resto de espaciador que está ligado a C-1 de una unidad de manosa en la configuración alfa.

15. El método de la reivindicación 14, en el que las unidades de manosa sustituidas con N ligadas comprenden la fórmula (1)



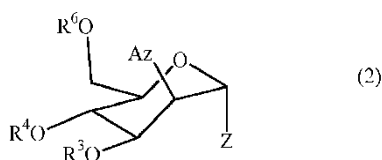
15 en la que cada Az representa un sustituyente aza;  
 cada  $R^3$  y  $R^4$  representa independientemente H o un grupo protector;  
 $R^6$  representa H, un grupo protector, o un conector unido a otra unidad de sacárido; uno de W y X es O, y el  
 20 otro de W y X es  $CH_2$ ;  
 n es 2;  
 un Y es =O y el otro Y es OR,  
 en el que R es H, alquilo C1-C6, o arilo C6-C12, o aril C6-C12-alquilo, o R es M, en la que M es un catión  
 monovalente; y  
 Z representa un resto que puede estar conjugado con una proteína, que puede estar en forma protegida.

16. El método de la reivindicación 15, que comprende además ligar la segunda unidad de manosa a un sacárido  
 adicional formando un enlace entre el oxígeno de  $OR^6$  en la fórmula (1) y el sacárido adicional.

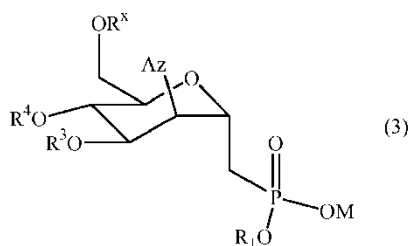
25 17. El método de la reivindicación 16, en el que el sacárido adicional está ligado a la segunda unidad de manosa  
 mediante un enlace 1,6-alfa.

30 18. El método de la reivindicación 14, en el que el método es un método para sintetizar un oligosacárido de unidades  
 de manosa ligadas en alfa, comprendiendo dicho método:

combinar una unidad de manosa que comprende la fórmula (2), en la que  $R^6$  es acilo C1-C6 o H, y  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  
 Az y Z son como se definen en la reivindicación 10;



45 con un monómero de alargamiento de fórmula (3), en el que  $R^x$  representa un grupo acilo C1-C6 y M  
 representa H o un catión;

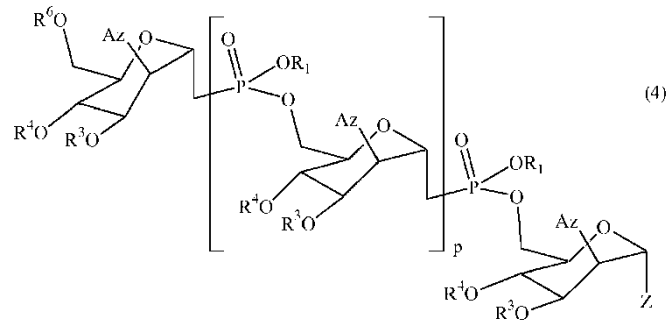


bajo condiciones de reacción de Mitsunobu, por el cual se obtiene un oligosacárido que comprende al menos  
 dos unidades de manosa sustituidas con 2-aza conectadas por un enlace 1,6-alfa.

60 19. El método de la reivindicación 18, en el que las condiciones de reacción de Mitsunobu se mantienen durante un  
 periodo prolongado de tiempo, por el cual se obtiene un oligosacárido de fórmula (4)

60

65



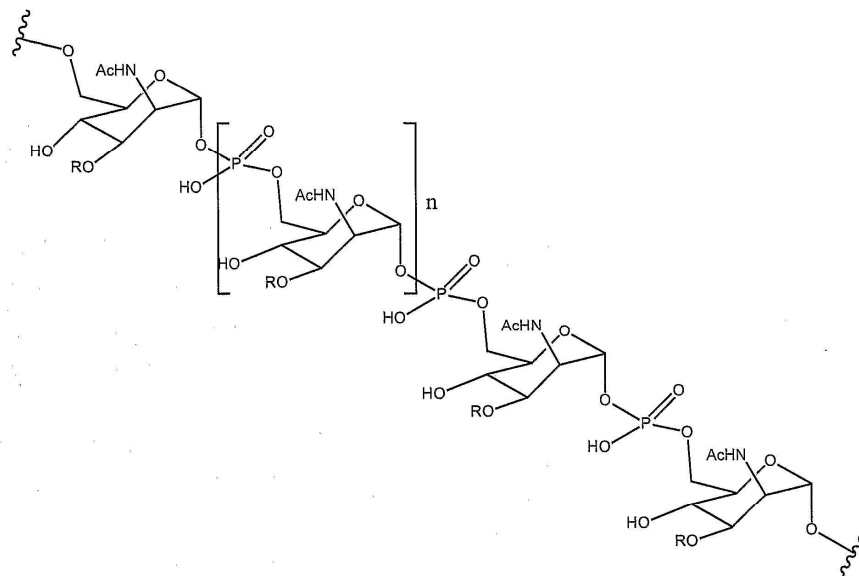
en la que p es un número entero de 1 a 20.

20. El método de la reivindicación 19, que comprende además conjugar el oligosacárido con una proteína; en el que la proteína es una toxina bacteriana inactivada seleccionada de toxoide diftérico, toxoide de pertussis, LT de *E. coli*, ST de *E. coli*, exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) o toxoide tetánico.
21. El oligosacárido de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en un método que comprende administrar una cantidad eficaz de un componente de vacuna de *Meningitidis A* a un sujeto, proporcionando así una respuesta inmunogénica.
22. Una composición que comprende al menos un oligosacárido de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que es tanto a) una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; como b) una composición inmunogénica.
23. La composición de la reivindicación 22, en la que el enlace fosfonato que comprende un enlace 1,6 se forma por una reacción de Mitsunobu.
24. La composición inmunogénica de la reivindicación 22 ó 23, que comprende al menos dos oligosacáridos diferentes que son específicos para al menos dos inmunitipos meningocócicos.
25. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 22-24, que comprende además un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.
26. La composición de la reivindicación 25, que comprende además (un) antígeno(s) derivado(s) de al menos uno de los serotipos A, B, C, W135 e Y de *Meningitidis*.
27. La composición de la reivindicación 26, en la que dicho antígeno se deriva del serotipo C, W135 o Y de *Meningitidis*.



**Figura 1**

Polisacarido Capsular Natural (CPS) de *N. meningitidis*



R representa H o Ac; aproximadamente el 70-80% del polisacarido capsular natural de *N. meningitidis* es acetilado en esta posición.

**Figura 2**

Unidades de Manosa de los anomeros Alfa y Beta sustituidos con 2-Desoxi-2-Aza

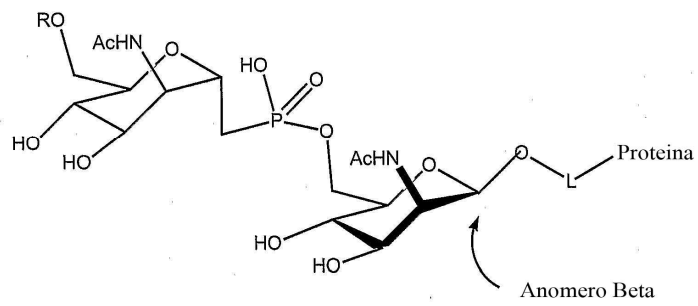
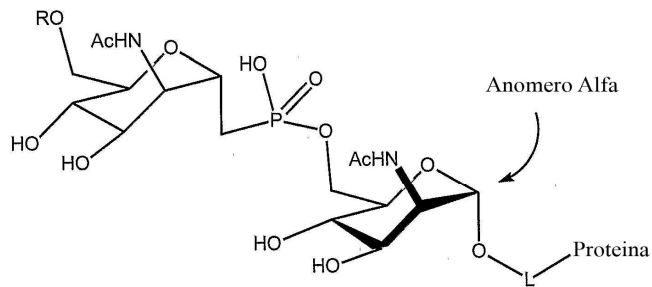


FIGURA 3

La Secuencia de Elongación para hacer los Oligosacaridos de la Invención

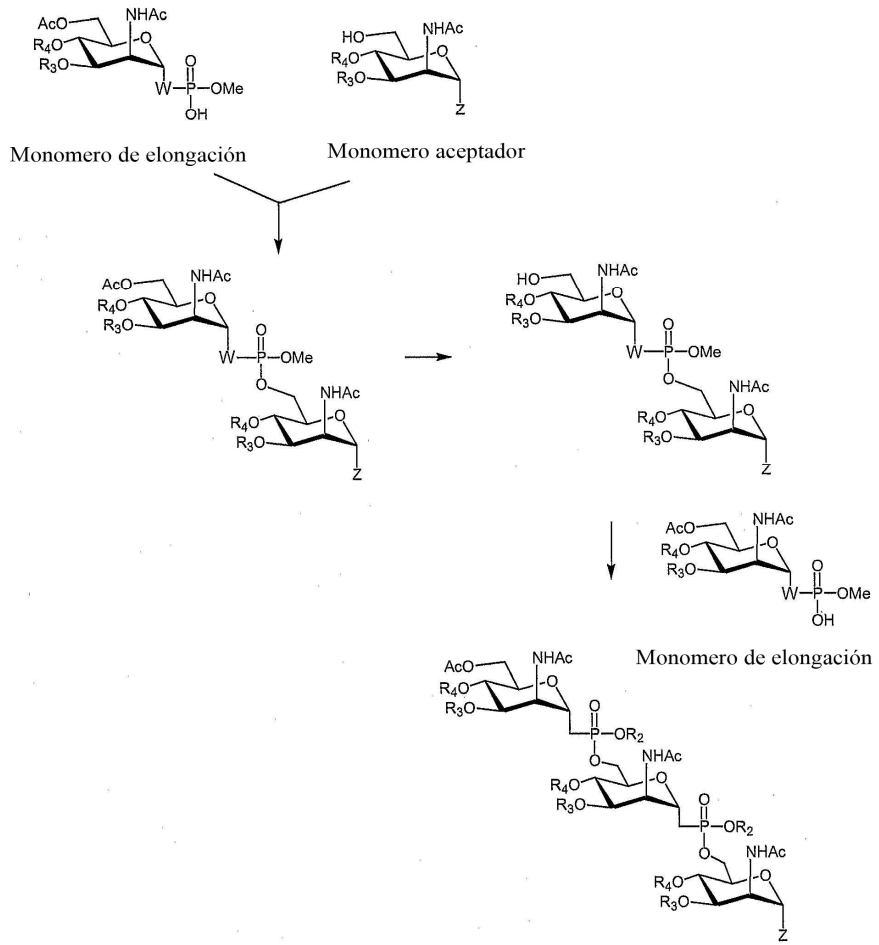


FIGURA 4

