

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 922 818**

51 Int. Cl.:

C07K 17/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2013 PCT/EP2013/072651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14067970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2013 E 13783923 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2022 EP 2911698**

54 Título: **Glucos conjugados y su uso como potenciales vacunas contra la infección por *Shigella flexneri***

30 Prioridad:

29.10.2012 EP 12306351

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

20.09.2022

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (25.0%)
28 rue du Docteur Roux
75015 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (25.0%) y
UNIVERSITÉ PARIS CITÉ (25.0%)**

72 Inventor/es:

**MULARD, LAURENCE;
CHASSAGNE, PIERRE;
SANSONETTI, PHILIPPE;
PHALIPON, ARMELLE;
TRAINCARD, FRANÇOIS y
NATO, FARIDA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 922 818 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).

DESCRIPCIÓN

Glucoconjugados y su uso como potenciales vacunas contra la infección por *Shigella flexneri*

Esta invención se refiere a composiciones y métodos para provocar una respuesta inmunogénica en mamíferos, incluidas respuestas que proporcionan protección contra infecciones bacterianas o reducen su gravedad. Más particularmente, se refiere al uso de oligo- o polisacáridos obtenidos por síntesis y conjugados de los mismos para inducir anticuerpos séricos que tienen actividad protectora contra *Shigella flexneri*, en particular *S. flexneri* serotipo 6 (SF6) o serotipo 6a (SF6a). Estos sacáridos y/o conjugados de los mismos son útiles como vacunas para inducir anticuerpos séricos que tienen actividad protectora contra *S. flexneri*, en particular SF6, o SF6a y son útiles para prevenir y/o tratar la shigelosis provocada por *S. flexneri*. Más generalmente, estos anticuerpos son útiles para prevenir o tratar infecciones por bacterias del género *Escherichia* o *Shigella*, particularmente infecciones por *S. flexneri* y *Escherichia coli*, en particular SF6, SF6a o *E. coli* O147.^[1]

La presente invención también se refiere a pruebas de diagnóstico para la shigelosis usando uno o más de los oligo- o polisacáridos o conjugados descritos anteriormente.

La shigelosis, una infección invasiva del colon humano, se identifica como una de las principales enfermedades diarreicas en todo el mundo.^[2] En su expresión más clásica, se caracteriza por una tríada de fiebre, cólicos intestinales y diarrea sanguinolenta.^[3] También conocida como disentería bacilar, esta infección altamente contagiosa se asocia con una mayor resistencia a los antibióticos.^[4] En su forma endémica, sigue siendo un importante problema de salud, especialmente en la población pediátrica que vive en las zonas más empobrecidas.^[4-5] *S. flexneri* - una de las cuatro especies de *Shigella* - prevalece en los países en desarrollo, donde representa una enfermedad endémica.^[4-6] Numeroso serotipos de *S. flexneri*, que varían en distribución geográfica y temporal, se aíslan de los pacientes. En los últimos años, el SF6 se identificó como un serotipo de prevalencia creciente en varios entornos en todo el mundo,^[4,7] y las evidencias apoyan fuertemente la inclusión del SF6 como una de las valencias clave para ser incluido en una vacuna de amplia cobertura de *Shigella*.^[5, 8]

Los serotipos de *S. flexneri* se definen sobre la base de la unidad de repetición de carbohidratos del antígeno O de superficie (O-Ag), que es la parte de polisacárido del lipopolisacárido (LPS) bacteriano.^[9] La protección frente a la reinfección por el serotipo homólogo, que sugiere una inmunidad natural específica del serotipo, se estableció después de la infección de *Shigella* y *E. coli* O147.^{[7a][10]} Estas observaciones proporcionaron una fuerte evidencia de que los O-Ag de *S. flexneri* son los principales objetivos de la inmunidad adaptativa del huésped. En consecuencia, varias vacunas candidatas, derivadas de LPS^[7b] o fragmentos del mismo, se han desarrollado contra la shigelosis y algunos de ellos se han evaluado durante ensayos clínicos.^[5, 12]

Kubler-Kielb J. et al. (Carbohydrate Research 2010, 345(11), páginas 1600-1608) describe inmunconjugados que comprenden albúmina de suero bovino (BSA) como un vehículo unido covalentemente a un fragmento de núcleo de *Shigella flexneri* 6 (tipo R1) que comprende la secuencia de tetrasacárido alfa-Rha-(1,4)-beta-GalA-(1,3)-beta-GalNAc-(1,3)-beta-Glc. Sin embargo, estos conjugados tienen secuencias de antígenos de oligosacáridos que difieren de las descritas en el presente documento.

Los inventores se han centrado ahora en el desarrollo de neoglucoconjugados bien definidos que se dirigen a infecciones provocadas por SF6. Los neoglucoconjugados objetivo se construyeron notablemente mediante la unión covalente de un inmunovehículo, que actúa como epítipo(s) T colaborador(es), con haptenos de carbohidrato (oligo o polisacárido) apropiados, trayendo epítipos B que imitan el SF6 O-Ag. Los neoglucoconjugados según la invención son útiles para obtener una respuesta inmunitaria dirigida contra el SF6 y, como tales, pueden incluirse en una composición de la vacuna para *Shigella*.

El objeto de la presente invención se define en el presente documento por las reivindicaciones 1 a 21.

Conjugados

En un primer objeto, la presente descripción proporciona un conjugado que no forma parte de la presente invención que comprende un oligo- o polisacárido seleccionado del grupo que consiste en:



en los que:

A es un residuo de ácido beta-D-galacturónico (1,3),

B es un residuo de N-acetil-beta-D-galactosamina (1,2),

C es independientemente, en cada aparición, un residuo alfa-L-ramnosa (1,2), en el que como máximo una de sus posiciones 3c o 4c es OAc (es decir O-C(=O)CH₃), siempre que cuando C sea un residuo terminal no reductor, su posición 2c pueda estar acetilada o no.

D es un residuo alfa-L-ramnosa (1,4),

5 x e y se seleccionan independientemente entre 0 y 1,

X e Y se seleccionan independientemente entre A, B, C, D, AB, BC, CD, DA, ABC, BCD, CDA, DAB,

y en el que n es un número entero comprendido entre 0 y 10,

siempre que x, y, y n no sean nulos simultáneamente,

estando dicho oligo- o polisacárido unido a un vehículo, en particular unido covalentemente a un vehículo.

10 La presente invención se refiere a un conjugado que comprende un oligo- o polisacárido de la siguiente fórmula: (X)_x-{CDAB}_n-(Y)_y

en el que:

A es un residuo de ácido beta-D-galacturónico (1,3),

B es un residuo de N-acetil-beta-D-galactosamina (1,2),

15 C es independientemente, en cada aparición, un residuo alfa-L-ramnosa (1,2), en el que como máximo una de sus posiciones 3c o 4c es OAc (es decir O-C(=O)CH₃), siempre que cuando C sea un residuo terminal no reductor, su posición 2c pueda estar acetilada o no.

D es un residuo alfa-L-ramnosa (1,4),

x e y se seleccionan independientemente entre 0 y 1,

20 X e Y se seleccionan independientemente entre A, B, C, D, AB, BC, CD, DA, ABC, BCD, CDA, DAB,

y en el que n es un número entero comprendido entre 1 y 6,

siempre que x, y, y n no sean nulos simultáneamente,

estando dicho oligo- o polisacárido unido covalentemente a un vehículo.

25 Los métodos para unir oligosacáridos y/o polisacáridos a una proteína no huésped no tóxica son bien conocidos en la técnica. El oligo- o polisacárido se puede unir covalentemente a un vehículo con o sin una molécula de unión o espaciador. La molécula de unión o espaciador no contiene ningún residuo de carbohidrato; por lo tanto, no es ni un residuo de carbohidrato ni un compuesto de oligo- o polisacárido. El oligo- o polisacárido se conjuga preferiblemente con un vehículo utilizando una molécula de unión. Un enlazador o agente de entrecruzamiento, como se usa en la presente invención, es preferiblemente una molécula pequeña, lineal o no, que tiene un peso molecular de aproximadamente <500 daltons y no es pirógeno ni tóxico en la forma del producto final.

30 Ventajosamente, además de asegurar la homogeneidad del producto y evitar la contaminación microbiana, el uso de oligo- o polisacáridos sintéticos es totalmente compatible con su sitio selectivo de unión al vehículo, abriendo así el camino a un proceso de conjugación reproducible. Por un lado, se evita el enmascaramiento incontrolado de epítomos importantes para la protección y, por otro lado, se hace posible eliminar los efectos secundarios generados por los neopítomos formados durante la conjugación.

35 Para conjugar con un enlazador o agente de entrecruzamiento, cualquiera del oligo- o polisacárido y el vehículo, o ambos, pueden unirse covalentemente a un primer enlazador. Los enlazadores o agentes de entrecruzamiento son moléculas homobifuncionales o heterobifuncionales,^[14] p.ej., dihidrazida adípica, etilendiamina, cistamina, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), N-succinimidil-[N-(2-yodoacetil)-β-alanil]propionato-propionato (SIAP), ácido 3,3'-ditiodipropiónico y similares. Según el tipo de enlace entre el oligo- o polisacárido y el vehículo, existe la posibilidad de preparar un conjugado en el que la relación del oligo- o polisacárido frente al vehículo puede variar entre 1:1 y 30:1. Preferiblemente, esta relación está comprendida entre 5:1 y 20:1.

40 Un vehículo puede ser un material natural, natural modificado, sintético, semisintético o recombinante que contiene uno o más grupos funcionales, por ejemplo, grupos amino primarios y/o secundarios, grupos azido, tiol o grupo carboxilo. El vehículo puede ser soluble o insoluble en agua. Los vehículos que cumplen estos criterios son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los vehículos adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen principalmente proteínas, péptidos, lipopéptidos, polisacáridos zwitteriónicos, agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivadas.

5 Los inmunovehículos son vehículos elegidos para aumentar la inmunogenicidad del oligo- o polisacárido y/o elevar los anticuerpos frente al vehículo que son médicamente beneficiosos.

Los inmunovehículos adecuados según la presente invención incluyen en particular proteínas, péptidos, lipopéptidos, agregados de lípidos que contienen péptidos T colaboradores (al menos uno) y partículas de virus inactivadas.

10 Según una realización ventajosa, el glucoconjugado de la invención se une covalentemente a una proteína o un péptido que comprende al menos un epítipo T colaborador, para su uso como vacuna frente a la infección con *S. flexneri*.

15 Los vehículos de proteínas que se sabe que tienen potentes epítipos T colaboradores incluyen, pero no se limitan a, toxoides bacterianos como los toxoides del tétanos, la difteria y el cólera, exotoxina o toxoide de *Staphylococcus*, Exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* y variantes destoxificadas genéticamente, producidas de forma recombinante, de las mismas, proteínas de membrana externa (OMP) de *Neisseria meningitidis* y proteínas de *Shigella*. Las cepas mutantes no tóxicas producidas de forma recombinante de exotoxina A de *P. aeruginosa* (rEPA) se describe y utilizan en vacunas conjugadas de polisacárido-proteína.^[15] El vehículo CMR197 es un mutante de toxina diftérica no tóxico bien caracterizado que es útil en preparaciones de vacunas glucoconjugadas destinadas para uso humano.^[16] Otros vehículos de proteínas ejemplares incluyen el Fragmento C de la toxina tetánica.^[17] También se ha descrito el vehículo CRM9 para la inmunización humana.^[18]

20 Los péptidos sintéticos que portan epítipos de células T colaboradoras inmunodominantes también pueden actuar como vehículos en conjugados de polisacáridos y oligosacáridos. Los vehículos de péptidos incluyen polipéptidos que contienen múltiples epítipos T colaboradores que abordan el amplio polimorfismo de las moléculas HLA,^[19] y epítipos colaboradores universales compatibles con el uso humano. Los epítipos ejemplares T colaboradores incluyen, pero no se limitan a, epítipos naturales caracterizados a partir del toxoide tetánico,^[20] y epítipos no naturales o epítipos diseñados tales como el epítipo PADRE que se une a pan HLA DR.^[21]

25 En una realización particular de la presente invención, el inmunovehículo se selecciona entre una proteína o un péptido que comprende al menos un epítipo T colaborador, o un derivado del mismo. En un aspecto particular, el inmunovehículo es el péptido PADRE. En otro aspecto, el inmunovehículo es el toxoide tetánico (TT) o un fragmento del mismo.

30 Otros tipos de vehículos incluyen, pero no se limitan a, biotina o liposomas. Los oligo- o polisacáridos conjugados con biotina o con una etiqueta están especialmente diseñados para diagnosticar infecciones de *S. flexneri*. En lo que respecta al uso de un liposoma como un vehículo, en particular aquellos que no implican enlaces covalentes, se podría hacer referencia a la Solicitud Internacional WO 2010/136947.

35 En una realización particular, el conjugado comprende un oligo- o polisacárido susceptible de unirse a un anticuerpo anti-*Shigella flexneri* de serotipo 6 y/o 6a, también llamado anticuerpo anti-SF6 y/o anti-SF6a, en particular un anticuerpo específico anti- *Shigella flexneri* de serotipo 6 y/o 6a. Preferiblemente, el anticuerpo anti- *Shigella flexneri* del serotipo 6 y/o 6a se une, en particular específicamente, al LPS de *Shigella flexneri* serotipo 6 y/o 6a.

40 En una realización particular, la mitad de la concentración inhibitoria máxima, es decir, el valor IC₅₀, de dicho oligo- o polisacárido con respecto a la unión del anticuerpo anti- *Shigella flexneri* de serotipo 6 y/o 6a a su objetivo, en particular el LPS de *Shigella flexneri* serotipo 6 y/o 6a, es inferior o igual a 500 μM, preferiblemente inferior o igual a 250 μM, más preferiblemente inferior o igual a 100 μM, lo más preferiblemente inferior o igual a 10 μM.

45 Como se usa en el presente documento, el valor IC₅₀ se define como la concentración de oligo- o polisacárido de la invención necesaria para inhibir el 50% de la unión de un anticuerpo anti-SF6 y/o anti-SF6a a su objetivo, en particular al LPS de *Shigella flexneri* serotipo 6 (SF6) o 6a (SF6a). Puede determinarse por cualquier método convencional, como el descrito en la referencia Phalipon A. et al (J. Immunol. 176 1686 (2006) o en la siguiente sección de ejemplo. En particular, el valor IC₅₀ se puede determinar realizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal, que se ha obtenido mediante la inmunización de un animal, en particular un ratón, mediante la cepa *Shigella flexneri* SF6 Sc544.

50 En otra realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma depositado en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM, París, Francia) según el Tratado de Budapest con el número I-4813, el 28 de octubre de 2013. En este sentido, la presente invención también se refiere al anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma depositado en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM, París, Francia) según el Tratado de Budapest con el número I-4813, el 28 de octubre de 2013.

55 Los anticuerpos anti SF6 y/o SF6a pueden obtenerse según métodos convencionales, como el descrito por Carlin NI y Lindbergh AA en Monoclonal antibodies specific for *Shigella flexneri* lipopolysaccharides: clones binding to type IV,

V, and VI antigens, group 3,4 antigen, and an epitope common to all *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* type I stains. Infect Immun. junio de 1987; 55(6):1412-20, o en la siguiente sección de ejemplo. En particular, los anticuerpos anti SF6 y/o SF6a pueden obtenerse inmunizando ratones con bacterias muertas por calor de la cepa Sc544 de *Shigella flexneri* del serotipo 6 (SF6), que produce hibridomas a partir de células de bazo de ratones inmunizados y selecciona hibridomas que secretan anticuerpos que se unen a LPS purificado de *Shigella flexneri* serotipo 6 (SF6) cepa Sc544.

En una realización particular, se incluyen conjugados como se definen en el presente documento, en los que X e Y se seleccionan independientemente entre AB, BC, CD, DA, ABC, BCD, CDA, DAB.

En una realización particular, se incluyen conjugados como se definen en el presente documento en los que x es 0 o y es 0, en particular en los que tanto x como y son 0.

En una realización particular que no forma parte de la invención, se incluyen conjugados como se definen en el presente documento, en los que el oligo- o polisacárido se selecciona del grupo que consiste en:

{BCDA}_n

{CDAB}_n

{DABC}_n

{ABCD}_n

A, B, C, D y n es un número entero comprendido entre 1 y 10.

En una realización particular, se incluyen conjugados como se definen en el presente documento, en los que el oligo- o polisacárido se selecciona del grupo que consiste en:

{CDAB}_n

A, B, C, D y n es un número entero comprendido entre 1 y 6.

En ciertos aspectos, se incluyen conjugados como se definen en el presente documento en los que la relación 3c-OAc/4c-OAc es superior a 1, siempre que cuando C sea un residuo final no reductor, su posición 2c pueda estar acetilada o no.

Como se usa en el presente documento, el término 3c-OAc (respectivamente 4c-OAc) se refiere al número de unidades de repetición, por cadena, que contienen un grupo OH ubicado en la posición 3 (respectivamente en la posición 4) del residuo alfa-L-ramnosa (residuo C) que está acetilado.

En un aspecto particular, el oligo- o polisacárido es {CDAB}_n, en el que A, B, C, D y n son como se definen anteriormente. Estos oligo- o polisacáridos se obtienen ventajosamente por síntesis química.

Composiciones inmunogénicas

En un segundo objeto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado según la invención y un vehículo fisiológicamente aceptable.

La composición de vacuna incluye uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables tales como agua, solución salina, glicerol, etanol. Además, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias reguladoras del pH y similares.

Los glucoconjugados de la presente invención que inducen anticuerpos protectores frente a la infección de *S. flexneri*, en particular SF6 y SF6a, se administran a un sujeto mamífero, preferiblemente un ser humano, en una cantidad suficiente para prevenir o atenuar la gravedad, el grado de duración de la infección de *S. flexneri*, en particular SF6 y SF6a.

Cada dosis de vacuna comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de conjugado de oligo- o polisacárido. Dicha cantidad variará dependiendo de la capacidad del sujeto para sintetizar anticuerpos frente al oligo- o polisacárido, el grado de protección deseado, el conjugado particular de oligo- o polisacárido seleccionado y su modo de administración, entre otros factores. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz apropiada. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar en un amplio rango que puede determinarse a través de ensayos rutinarios.

Más particularmente, el conjugado de oligo- o polisacárido de la invención se administrará en una cantidad terapéuticamente eficaz que comprende de 1 µg a 100 µg, en particular de 1 µg a 50 µg de oligo- o polisacárido, preferiblemente de 1 µg a 10 µg. Se puede determinar una cantidad óptima para una vacuna en particular mediante estudios estándar que involucran la medición de los títulos de anticuerpos LPS anti-SF6 y/o SF6a en sujetos, títulos de anticuerpos protectores más precisos.

Después de una administración inicial, los sujetos pueden recibir una o dos inyecciones de refuerzo en intervalos de aproximadamente cuatro semanas. Para lactantes menores de 12 meses de edad, se pueden administrar dos dosis a intervalos de no menos de dos meses, no administrándose la primera dosis antes de los 2 meses de edad.

5 La composición inmunogénica de la invención se puede administrar con o sin adyuvante. Los adyuvantes generalmente combinados con vacunas glucoconjugadas permiten fortalecer la respuesta de anticuerpos y, por lo tanto, la respuesta B. Los adyuvantes se pueden añadir directamente a las composiciones de vacuna o se pueden administrar por separado, al mismo tiempo o poco después de la administración de la vacuna. Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio (hidróxido de aluminio), formulaciones de emulsión de aceite en agua con o sin agentes estimulantes específicos como péptidos de muramilo, adyuvantes de saponina, citocinas, mutantes detoxificados de toxinas bacterianas como la toxina del cólera, la toxina pertussis, o la toxina termolábil *E. coli*.

10 La composición inmunogénica de la invención se puede administrar con otros inmunógenos o agentes inmunorreguladores, por ejemplo, inmunoglobulinas, citocinas, linfocinas y quimiocinas.

15 En un aspecto particular, la composición inmunogénica comprende además un inmunógeno que proporciona protección frente a otro patógeno, como por ejemplo, *S. flexneri* serotipo 1b, 2a y 3a, miembros de otras especies *Shigella* como *S. sonnei* y *S. disentería* tipo 1, o patógenos responsables de la enfermedad diarreica en humanos.

Típicamente, las composiciones de vacunas se preparan como inyectables como soluciones líquidas o suspensiones; o como formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en un vehículo líquido antes de la inyección. La preparación se puede emulsionar o encapsular en liposomas para mejorar el efecto adyuvante. A este respecto, podría hacerse referencia a la Solicitud Internacional WO 2010/136947.

20 Una vez formuladas, las composiciones de vacuna pueden administrarse por vía parenteral, por inyección, ya sea subcutánea, intramuscular o intradérmica.

Las formulaciones alternativas adecuadas para otro modo de administración incluyen formulaciones orales e intranasales.

Oligo- o polisacáridos (Ia)

25 En un aspecto adicional, la descripción proporciona oligo- o polisacárido (Ia) que no forman parte de la presente invención seleccionados del grupo que consiste en:



30 $(X)_x-\{A B C D\}_n-(Y)_y-OQ$

en los que:

A, B, C, D, X, Y, x, y, y n son como se definen arriba,

O es la C₁ átomo de oxígeno del residuo final reductor del oligo- o polisacárido,

Q es H, o un grupo LZ,

35 L es un cadena alquílica o alquénica C₁-C₁₂ divalente opcionalmente interrumpida por uno o más heteroátomos, en particular seleccionados entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un átomo de nitrógeno, estando dichos átomos de nitrógeno y azufre opcionalmente oxidados, estando el átomo de nitrógeno opcionalmente implicado en un enlace acetamida divalente (-NHC=O-), y

40 Z es una función reactiva terminal, opcionalmente protegida, capaz de formar un enlace covalente con un vehículo y/o un soporte sólido.

La presente invención se refiere a un oligo- o polisacárido (Ia) de la siguiente fórmula:



en el que:

A, B, C, D, X, Y, x e y son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,

45 n es un número entero comprendido entre 0 y 10, O es átomo de oxígeno C₁ del residuo final reductor del oligo- o polisacárido,

Q es H, o un grupo LZ,

L es una cadena alquílica o alquénica divalente C₁-C₁₂ opcionalmente interrumpida por uno o más heteroátomos, en particular seleccionados entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un átomo de nitrógeno, estando opcionalmente oxidados dichos átomos de nitrógeno y azufre, estando el átomo de nitrógeno opcionalmente implicado en un enlace acetamida, y

Z es una función reactiva terminal, opcionalmente protegida, capaz de formar un enlace covalente con un vehículo y/o un soporte sólido.

Preferiblemente, el oligo- o polisacárido (Ia) no es {CDAB}-OH.

En un aspecto preferido, Z es Hal, biotina, alquénilo C₂-C₆, alquínilo C₂-C₆, azido, alcoxi, epóxido, acetal, C(=O)H, SR₁, NH₂ o NHC(=O)CH₂Hal,

siendo R₁ H, C(=O)CH₃ o SR₂, y

siendo R₂ un alquilo C₁-C₆, un arilo C₆-C₁₀, o un heteroarilo de 5 a 7 miembros, como piridilo, o cualquier grupo que permita convertir SSR₂ en SH.

En otro aspecto, el oligo- o polisacárido definido anteriormente se inmoviliza sobre un soporte sólido.

Kits para el diagnóstico de la infección por SF6

En otro objeto, la invención proporciona un kit para el diagnóstico *in vitro* de infección por SF6, en el que dicho kit comprende un oligo- o polisacárido (Ia) como se define en el presente documento, opcionalmente unido a una etiqueta o un soporte sólido.

En una realización particular, el oligo- o polisacárido (Ia) según la presente invención se utilizan, *en vitro*, como reactivos de diagnóstico específicos de SF6 en inmunoensayos estándar.

Alternativamente, los oligo- o polisacáridos (Ia) según la presente invención se utilizan para probar la presencia de anticuerpos específicos de SF6. Los oligo- o polisacáridos pueden usarse para estudios epidemiológicos, por ejemplo, para determinar la distribución geográfica y/o la evolución de la infección por SF6 en todo el mundo, así como para evaluar la respuesta de anticuerpos específicos de SF6 inducida por un inmunógeno.

Los oligo- o polisacáridos (Ia) según la presente invención se puede marcar y/o inmovilizar ventajosamente sobre una fase sólida, según los protocolos estándar conocidos por el experto en la materia. Dichas etiquetas incluyen, pero no se limitan a, enzimas (fosfatasa alcalina, peroxidasa), moléculas luminiscentes o fluorescentes. Por ejemplo, un oligo- o polisacárido conjugado con biotina, según la presente invención, puede inmovilizarse en una fase sólida para detectar la presencia de anticuerpos específicos de SF6 en muestras biológicas.

Dichos inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de aglutinación, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, ensayos de fluorescencia, electroinmunotransferencia y similares.

Dichos ensayos pueden ser, por ejemplo, de formato directo (donde el oligo- o polisacárido marcado (Ia) es reactivo con el anticuerpo a detectar), un formato indirecto (donde un anticuerpo secundario marcado es reactivo con dicho oligo- o polisacárido (Ia)), o un formato competitivo (adición de un oligo- o polisacárido marcado (Ia)).

Para todos los usos terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico, los oligo- o polisacáridos (Ia) de la invención, solos o unidos a un vehículo, así como los anticuerpos y otros reactivos necesarios y los dispositivos y accesorios apropiados pueden proporcionarse en forma de kit para que estén fácilmente disponibles y sean fáciles de usar.

Oligo- o polisacárido (Ib)

En otro objeto, la descripción proporciona oligo- o polisacáridos (Ib) que no forman parte de la presente invención seleccionados del grupo que consiste en:



en los que:

A es un residuo de ácido beta-D-galacturónico (1,3),

B es un residuo de beta-D-galactosamina (1,2) *N*-protegido, en el que dicho grupo *N*-protector es un grupo acetilo, o un precursor del mismo tal como un grupo *N*-tricloroacetilo,

C es un residuo de alfa-L-ramnosa (1,2), en el que como máximo uno de 3c o 4c es OAc,

D es un residuo de alfa-L-ramnosa (1,4),

5 x e y se seleccionan independientemente entre 0 y 1,

n es un número entero comprendido entre 0 y 10,

siempre que x, y, y n no sean nulos simultáneamente,

X e Y se seleccionan independientemente entre A, B, C, D, AB, BC, CD, DA, ABC, BCD, CDA, DAB,

en el que cada OH y/o grupo CO₂H de dichos residuos está opcionalmente protegido por un grupo protector,

10 W es ORⁱ, SRⁱⁱ o Hal, en el que dichos O, S y Hal son el heteroátomo C₁ del residuo terminal reductor de la cadena de oligo- o polisacárido, estando S opcionalmente oxidado,

Rⁱ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo activador de hidroxilo anomérico o un grupo LZ, siendo L y Z como se definen anteriormente para la fórmula (Ia),

15 Rⁱⁱ es alquilo C₁-C₁₂, arilo C₆-C₁₀, un imidato que conduce preferentemente a S-tiazolinilo (STaz) o S-benzoxazolilo (SBox),^[22]

y en el que n es un número entero comprendido entre 0 y 10

siempre que x, y, y z no sean nulos simultáneamente.

La presente invención se refiere a un oligo- o polisacárido (Ib) de la siguiente fórmula:



20 en el que:

A es un residuo de ácido beta-D-galacturónico (1,3),

B es un residuo de beta-D-galactosamina (1,2) *N*-protegido, en el que dicho grupo *N*-protector es un grupo acetilo, o un precursor del mismo tal como un grupo *N*-tricloroacetilo,

C es un residuo de alfa-L-ramnosa (1,2), en el que como máximo uno de 3c o 4c es OAc,

25 D es un residuo de alfa-L-ramnosa (1,4),

x e y se seleccionan independientemente entre 0 y 1,

n es un número entero comprendido entre 0 y 10,

siempre que x, y, y n no sean nulos simultáneamente,

X e Y se seleccionan independientemente entre A, B, C, D, AB, BC, CD, DA, ABC, BCD, CDA, DAB,

30 en el que cada OH y/o grupo CO₂H de dichos residuos está opcionalmente protegido por un grupo protector,

W es ORⁱ, SRⁱⁱ o Hal, en el que dichos O, S y Hal son el heteroátomo C₁ del residuo terminal reductor de la cadena de oligo- o polisacárido, estando S opcionalmente oxidado,

Rⁱ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo activador de hidroxilo anomérico o un grupo LZ, siendo L y Z como se definen anteriormente para la fórmula (Ia),

35 Rⁱⁱ es alquilo C₁-C₁₂, arilo C₆-C₁₀, un imidato que conduce preferentemente a S-tiazolinilo (STaz) o S-benzoxazolilo (SBox).

Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo precursor de acetilo" se refiere a un grupo químico que se puede convertir en un radical CH₃-CO-, especialmente por reducción. Los ejemplos de dichos precursores de acetilo incluyen en particular el grupo tricloroacetilo.

40 Alternativamente, el grupo *N*-protector se puede elegir entre los bien conocidos por los expertos en la técnica, siempre que se asegure la asistencia anquimérica durante la construcción del enlace B-C.^[23]

Los grupos OH de los residuos pueden estar protegidos por grupos protectores de hidroxilo. Los grupos protectores de hidroxilo adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica.^[24] Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo adecuados incluyen en particular bencilo (Bn), levulinoilo (Lev), *para*-metoxibencilo (PMB), pivaloilo (PIV), cloroacetilo (ClAc), *terc*-butildifenilsililo (TBDPS), 2-naftilmetilo NAP, acetales en particular acetal de bencilideno (Bzl).

5 Más específicamente, los grupos OH distintos de los que están en las posiciones 3c, o los que participan en un enlace glucosídico, es decir, los que se encuentran en las posiciones 4_A, 3_B, 2_C y 2_D del residuo terminal no reductor correspondiente (sitio aceptor), puede protegerse en una denominada "forma permanente", por ejemplo en forma de éter bencílico (Bn) o acetal de bencilideno (Bzl), mientras que los grupos hidroxilo antes mencionados están protegidos por un denominado grupo protector temporal/ortogonal, que es un grupo protector que es selectivamente escindible en presencia de los otros grupos protectores en su lugar. Dichos grupos protectores temporales son bien conocidos por el experto en la materia,^[24] y puede, en particular, seleccionarse independientemente del grupo que consiste en acetilo (Ac), cloro- o bromoacetilo (BrAc, ClAc), levulinoilo (Lev), benzoilo (Bz) posiblemente sustituido, pivaloilo (PIV), *para*-metoxibencilo (PMB), 2-naftilmetilo (NAP), *terc*-butildimetilsililo (TBDMS), *terc*-butildifenilsililo (TBDPS).

10 Más específicamente, los grupos hidroxilo ubicados en la posición 2 de los residuos A, C y D, involucrados en la construcción de los enlaces glucosídicos A-B, C-D y D-A, respectivamente, se seleccionan entre aquellos capaces de asegurar la asistencia anquimérica durante el paso de glucosilación. Dichos grupos protectores son bien conocidos por el experto en la materia y, en particular, pueden seleccionarse independientemente de los grupos que dan lugar a la formación de un éster, en particular del conjunto que consiste en acetilo (Ac), cloro- o bromoacetilo (BrAc, ClAc), levulinoilo (Lev), benzoilo (Bz) posiblemente sustituido y pivaloilo (PIV).

15 En cierto aspecto, se incluyen oligo- o polisacáridos (Ib) como se define en el presente documento, en el que 3c es *O*-*para*-metoxibencilo (es decir, OPMB) u *O*-acetilo (es decir, OAc), y 4c es *O*-bencilo (es decir, OBn).

En otra realización, se incluyen oligo- o polisacáridos (Ib) como se define en el presente documento, en el que 4_A, 3_B, 2_C y 2_D del residuo terminal no reductor homólogo (sitio aceptor) es OH, y el OH único en la molécula, de hecho, es un sitio aceptor.

20 En otra realización más, se incluyen oligo- o polisacáridos (Ib) como se definen en el presente documento, en el que el resto CO₂H del (de los) residuo(s) A está(n) protegido(s) en forma de un éster ortogonal a un acetato, en particular un éster bencílico (CO₂Bn).

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "éster ortogonal a un acetato" significa que, en condiciones de reacción específicas, es posible escindir de forma quimioselectiva esa función éster para desenmascarar el resto CO₂H del (de los) residuo(s) A -dentro de los oligo- o polisacáridos (Ib) - en presencia de un grupo *O*-acetilo en cualquiera de sus posiciones 3c o 4c.

30 Rⁱ del residuo terminal reductor puede ser un grupo protector de hidroxilo, especialmente seleccionado de metilo (Me), alilo (AlI), *para*-metoxifenilo (PMP), o un resto sililo, preferiblemente un 2-(trimetilsilil)etilo (SE), *terc*-butildimetilsililo (TBDMS) o *terc*-butildifenilsililo (TBDPS).

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo activador de hidroxilo anomérico" se refiere a un grupo capaz de hacer que el grupo hidroxilo anomérico sea más reactivo frente a un nucleófilo en condiciones apropiadas.^[25] Los ejemplos de grupos activadores de hidroxilo incluyen en particular imidatos, como tricloroacetimidoilo (TCA) o *N*-feniltrifluoroacetimidoilo (PTFA), pentenilo, alilo, propargilo, fosfato, acetato o un ortoéster u oxazolona que implique el O o N en la posición 2, en el caso de los residuos A, C o D y el residuo B, respectivamente.

40 Estos oligo- o polisacáridos son útiles como productos intermedios para preparar los conjugados o los oligo- o polisacáridos (Ia) como se define anteriormente.

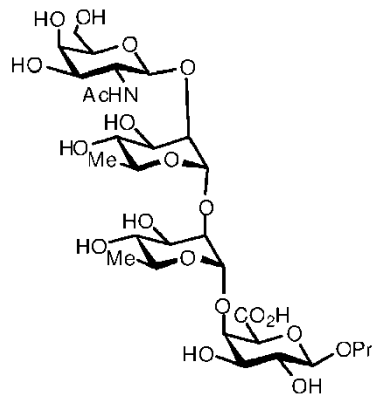
En un aspecto particular se incluyen oligo- o polisacáridos (Ib) como se definen en el presente documento, donde n es 0 o 1.

45 En otro aspecto se incluyen oligo- o polisacáridos (Ib) como se define en el presente documento, en el que x y/o es/son 0.

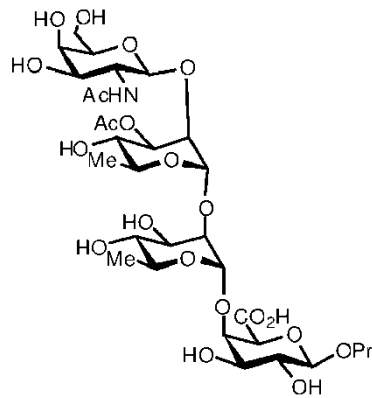
En un aspecto preferido, se incluyen oligo- o polisacáridos (Ib) como se define en el presente documento, en el que W es ORⁱ y Rⁱ es H, propilo, alilo, *N*-feniltrifluoroacetimidoilo (PTFA).

50 En una realización preferida, se incluyen oligo- o polisacáridos (Ib) como se define en el presente documento seleccionado del grupo que consiste en:

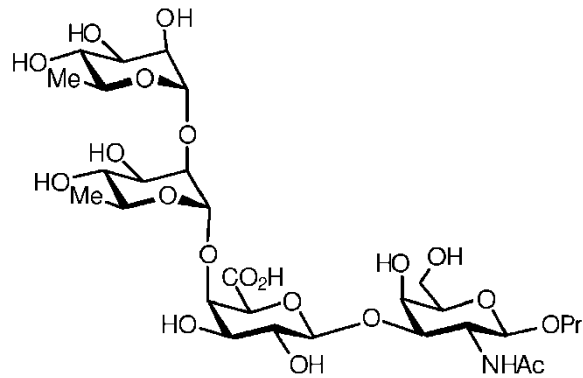
- Propilo 2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β-D-galactopiranosidurónico (XXX);



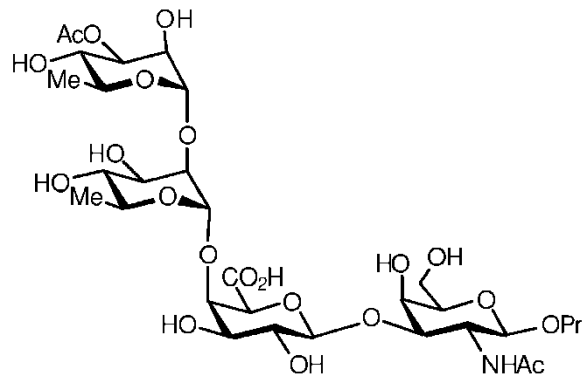
- Propilo 2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-(3-O-acetil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β-D-galactopiranosidurónico (XXXI);



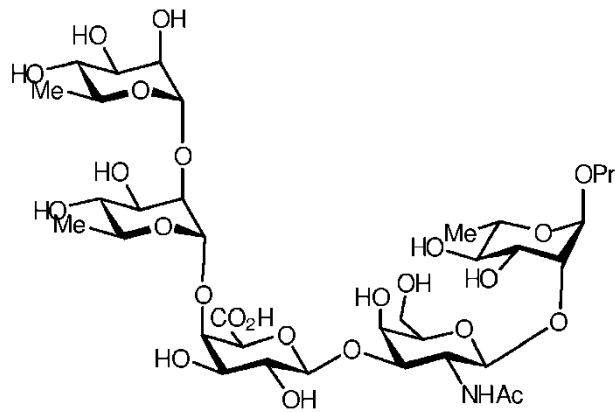
- 5
- Propilo α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosido (XXXV);



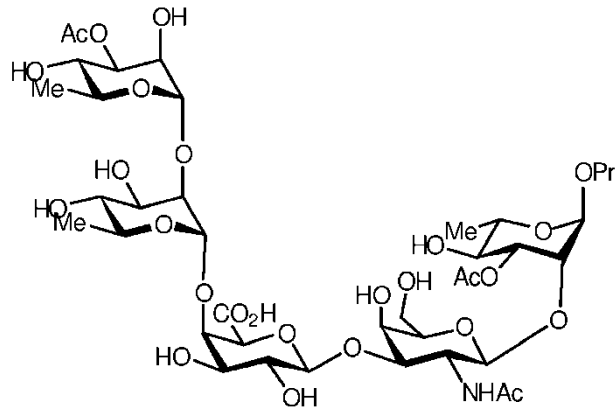
- Propilo 3-O-acetil-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosido (XXXVI);



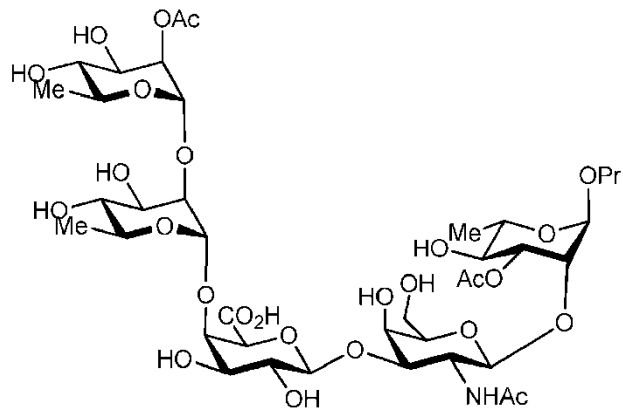
- Propilo α -L-ramnopiranosil-(1→2)- α -L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1→2)- α -L-ramnopiranosido (XX)



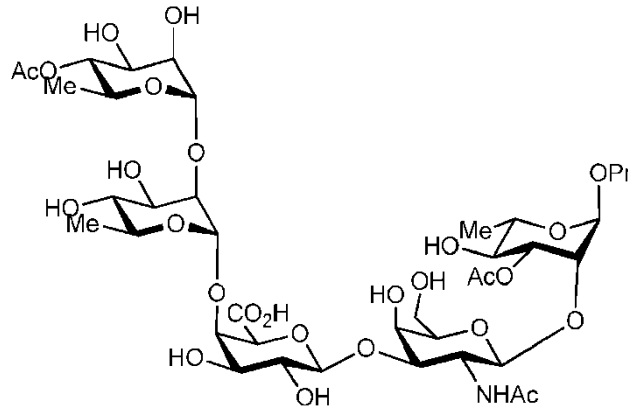
- 5
- Propilo 3-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1→2)- α -L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1→2)-3-O-acetil- α -L-ramnopiranosido (XIX);



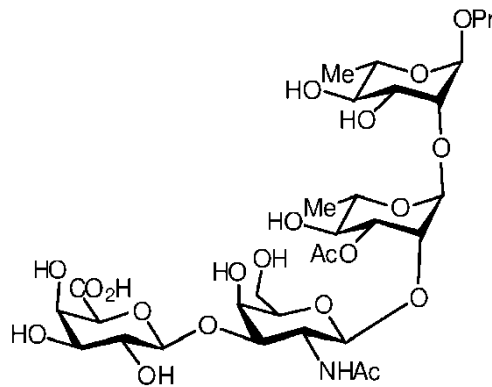
- Propilo 2-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1→2)- α -L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1→2)-3-O-acetil- α -L-ramnopiranosido (XIX')



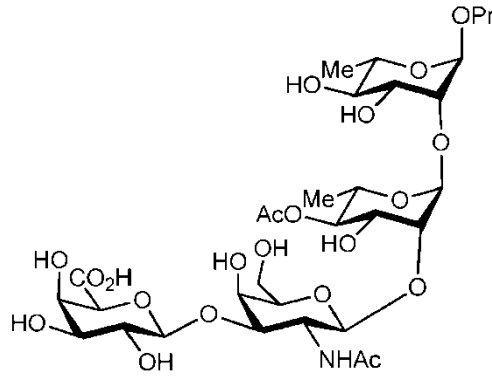
- Propilo 4-O-acetilo- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O-acetil- α -L-ramnopiranosido (XIX).



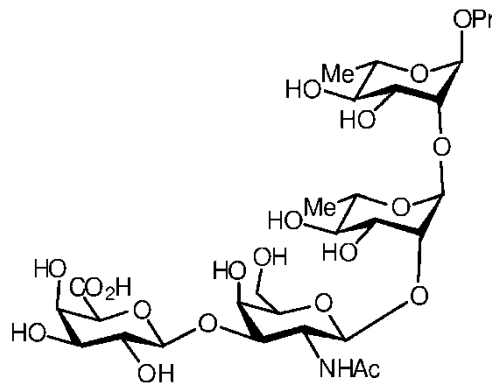
- 5
- Propilo ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosido (XII);



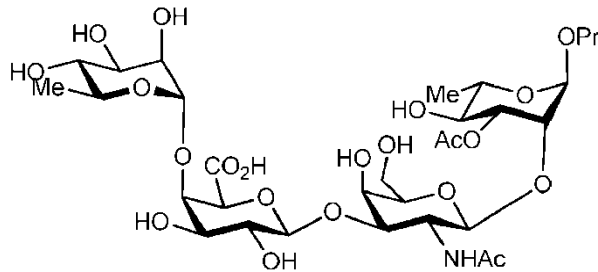
- Propilo ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-4-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosido (XII');



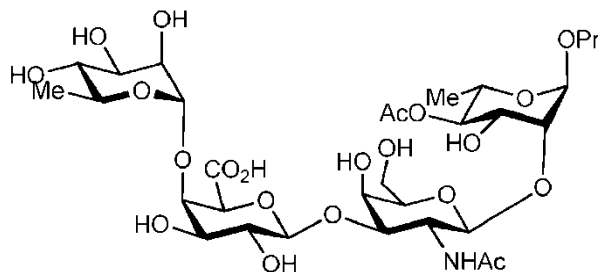
- Propilo ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosido (XIV);



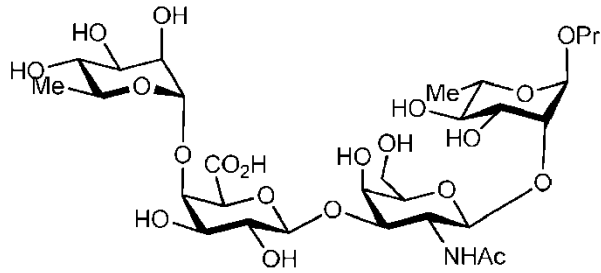
- 5
- Propilo α-L-ramnopiranosil-(1→4)- ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-3-O-acetil-α-L-ramnopiranosido (XV);



- Propilo α-L-ramnopiranosil-(1→4)- ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-4-O-acetil-α-L-ramnopiranosido (XV');

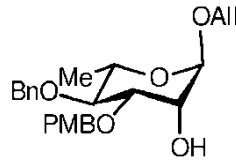


- 10
- Propilo α-L-ramnopiranosil-(1→4)- ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1-2)-α-L-ramnopiranosido (XVI);

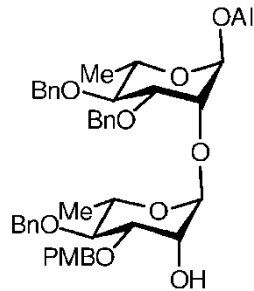


En otro objeto, se describen en el presente documento oligosacáridos (Ic) seleccionados del grupo que consiste en:

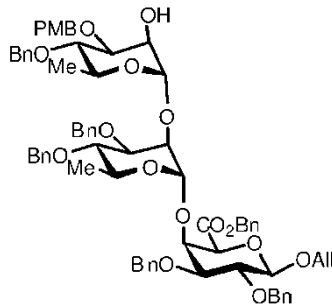
- Alilo 4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil- α -L-ramnopiranosido (9), también designado HO-C,



- 5
- Alilo (4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-3,4-di-*O*-bencilo- α -L-ramnopiranosido (48), también designado HO-CD,

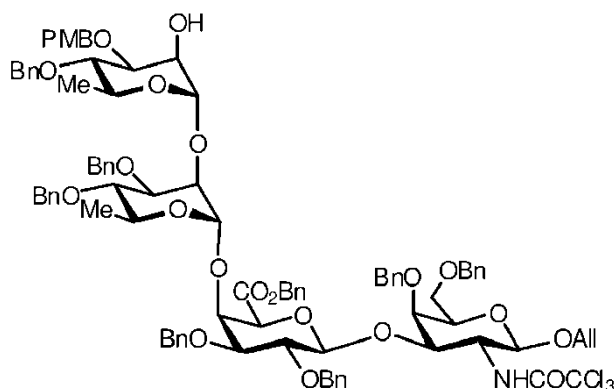


- bencilo (4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-bencilo- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(alilo 2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosido)uronato (169), también designado HO-CDA,

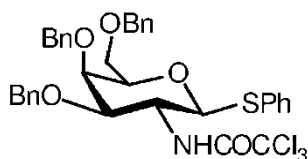


10

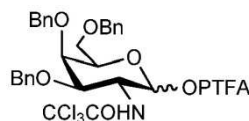
- Alilo (4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-bencilo- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(bencil 2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosido (280), también designado HO-CDAB,



- Fenilo 3,4,6-tri-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-1-tio-β-*D*-galactopiranosido (24), también designado B-SPh, que no forma parte de la presente invención,

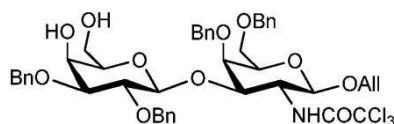


- 5
- 3,4,6-Tri-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-α/β-*D*-galactopiranosilo *N*-feniltrifluoroacetimidato (181), también designado B-PTFA, que no forma parte de la presente invención,



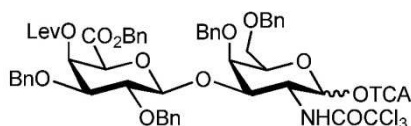
Fórmula química : C₃₇H₃₄Cl₃F₃N₂O₆
 Masa exacta: 764,1435
 Peso molecular: 766,0299

- Alilo (2,3-di-*O*-bencil-β-*D*-galactopiranosil)-(1→3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-*D*-galactopiranosido (241), también designado (HO)₂-AB



Fórmula química: C₄₅H₅₀Cl₃NO₁₁
 Masa exacta: 885,2449
 Peso molecular: 887,2376

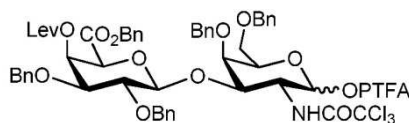
- 10
- (Bencilo 2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinoil-β-*D*-galactopiranosiluronato)-(1→3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-tricloroacetimidato de α-*D*-galactopiranosilo (246), también designado AB-TCA,



Fórmula química: C₅₆H₅₆Cl₃N₂O₁₄
 Masa exacta: 1190,1863
 Peso molecular: 1193,7668

ES 2 922 818 T3

- Bencil 2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinoil-β-D-galactopiranosiluronato-(1→3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-α/β-D-galactopiranosilo *N*-feniltrifluoroacetimidato (247), también designado AB-PTFA,

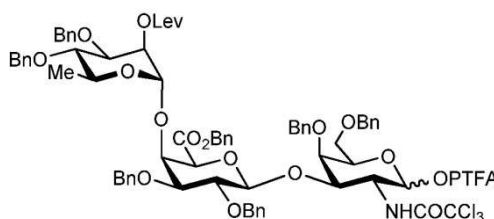


Fórmula química: $C_{62}H_{60}Cl_3F_3N_2O_{14}$

Masa exacta: 1218,3062

Peso molecular: 1220,4990

- 5
- (3,4-Di-*O*-bencil-2-*O*-levulinoil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(bencil 2,3-di-*O*-bencil-β-D-galactopiranosiluronato)-(1→3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-α/β-D-galactopiranosilo *N*-feniltrifluoroacetimidato (283), también designado DAB-PTFA,

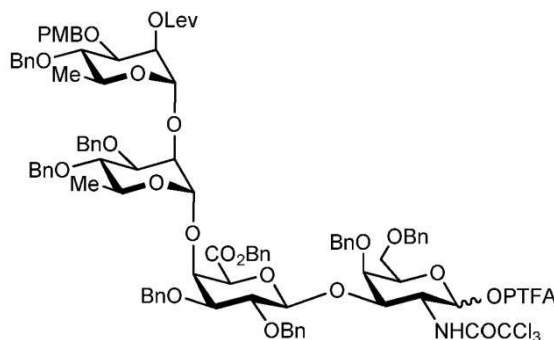


Fórmula química: $C_{82}H_{82}Cl_3F_3N_2O_{18}$

Masa exacta: 1544,4580

Peso molecular: 1546,8853

- 10
- (4-*O*-Bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil-2-*O*-levulinoil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-*O*-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(bencil 2,3-di-*O*-bencil-β-D-galactopiranosiluronato)-(1→3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-α/β-D-galactopiranosil *N*-feniltrifluoroacetimidato (284), también designado CDAB-PTFA,

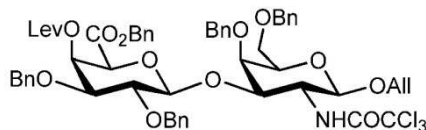


Fórmula química: $C_{103}H_{106}Cl_3F_3N_2O_{23}$

Masa exacta: 1900,6204

Peso molecular: 1903,2975

- Alilo (bencil 2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinoil-β-D-galactopiranosiluronato)-(1→3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosido (244), también designado AB

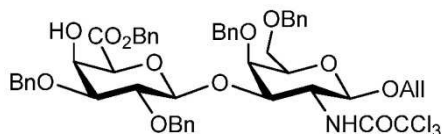


Fórmula química: $C_{57}H_{60}Cl_3NO_{14}$

Masa exacta: 1087,3079

Peso molecular: 1089,4436

- Alilo (bencil 2,3-di-O-bencil-β-D-galactopiranosiluronato)-(1→3)-4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosido (242), también designado HO-AB,

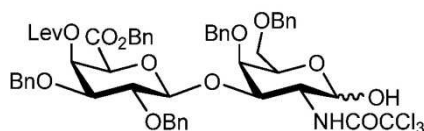


Fórmula química: $C_{52}H_{54}Cl_3NO_{12}$

Masa exacta: 989,2712

Peso molecular: 991,3437

- 5
- (Bencil 2,3-di-O-bencil-4-O-levulinoil-β-D-galactopiranosiluronato)-(1→3)-4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-α/β-D-galactopiranososa (245), también designado AB-OH.



Fórmula química: $C_{54}H_{56}Cl_3NO_{14}$

Masa exacta: 1047,2766

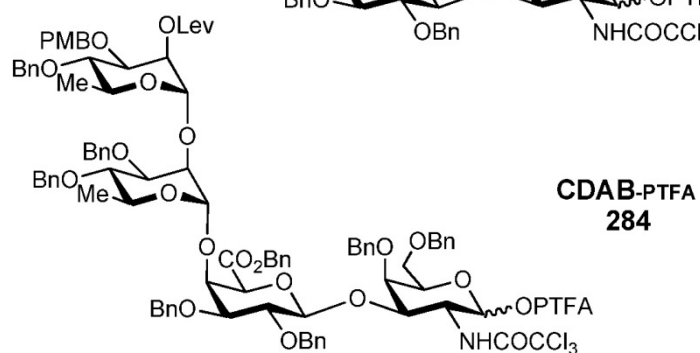
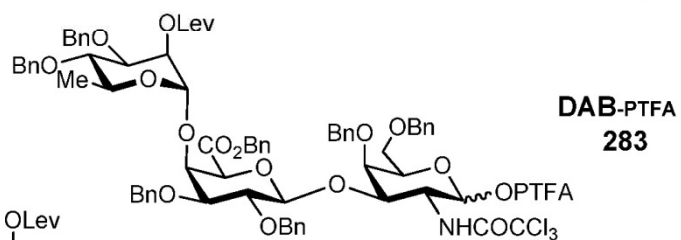
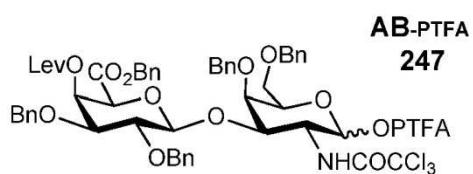
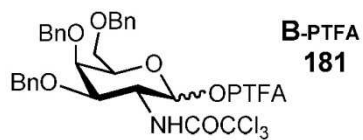
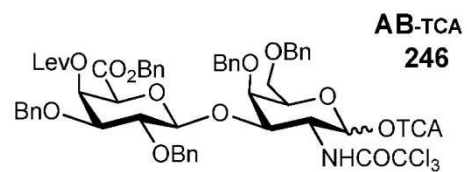
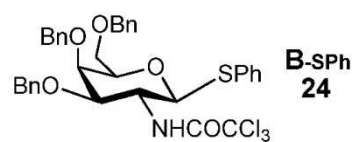
Peso molecular: 1049,3797

- 10
- Oligo- o polisacáridos (Ic) son particularmente ventajosos ya que proporcionan un acceso eficiente a los oligo- o polisacáridos que tienen más de una unidad de repetición (Ib) y (Ia) en un número reducido de pasos, según una síntesis convergente. En particular, los oligo- o polisacáridos (Ic) se pueden dividir en dos grupos: aceptores, que definen el extremo reductor de la cadena del polisacárido y donantes, que generalmente están implicados en el alargamiento de la cadena y, en particular, que fijan el extremo no reductor de la cadena del polisacárido. En la Tabla I se enumeran ejemplos seleccionados de donantes y aceptores preferidos.

Como se usa en el presente documento, el término "donante" se refiere más particularmente a un mono-, oligo- o polisacárido que lleva un grupo saliente en la posición anomérica.

- 15
- Como se usa en el presente documento, el término "aceptor" se refiere más particularmente a un mono-, oligo- o polisacárido que tiene al menos un grupo hidroxilo libre, en general distinto del hidroxilo anomérico, preferiblemente un solo grupo hidroxilo libre correspondiente al sitio de elongación de la cadena creciente.

DONANTES



ACEPTORES

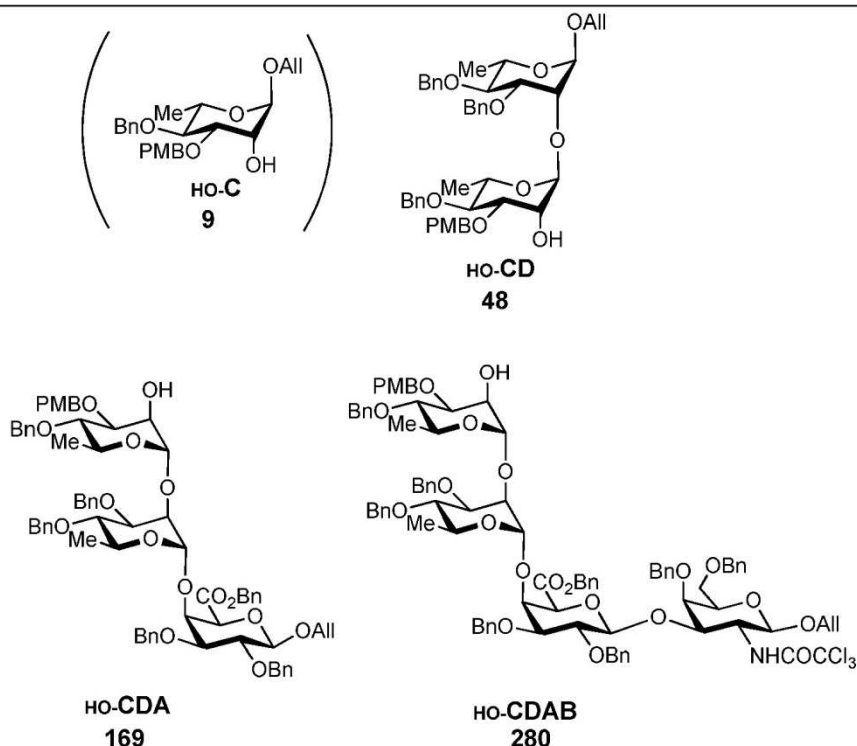
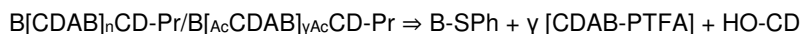
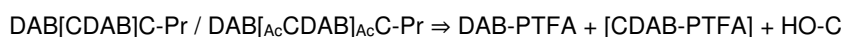
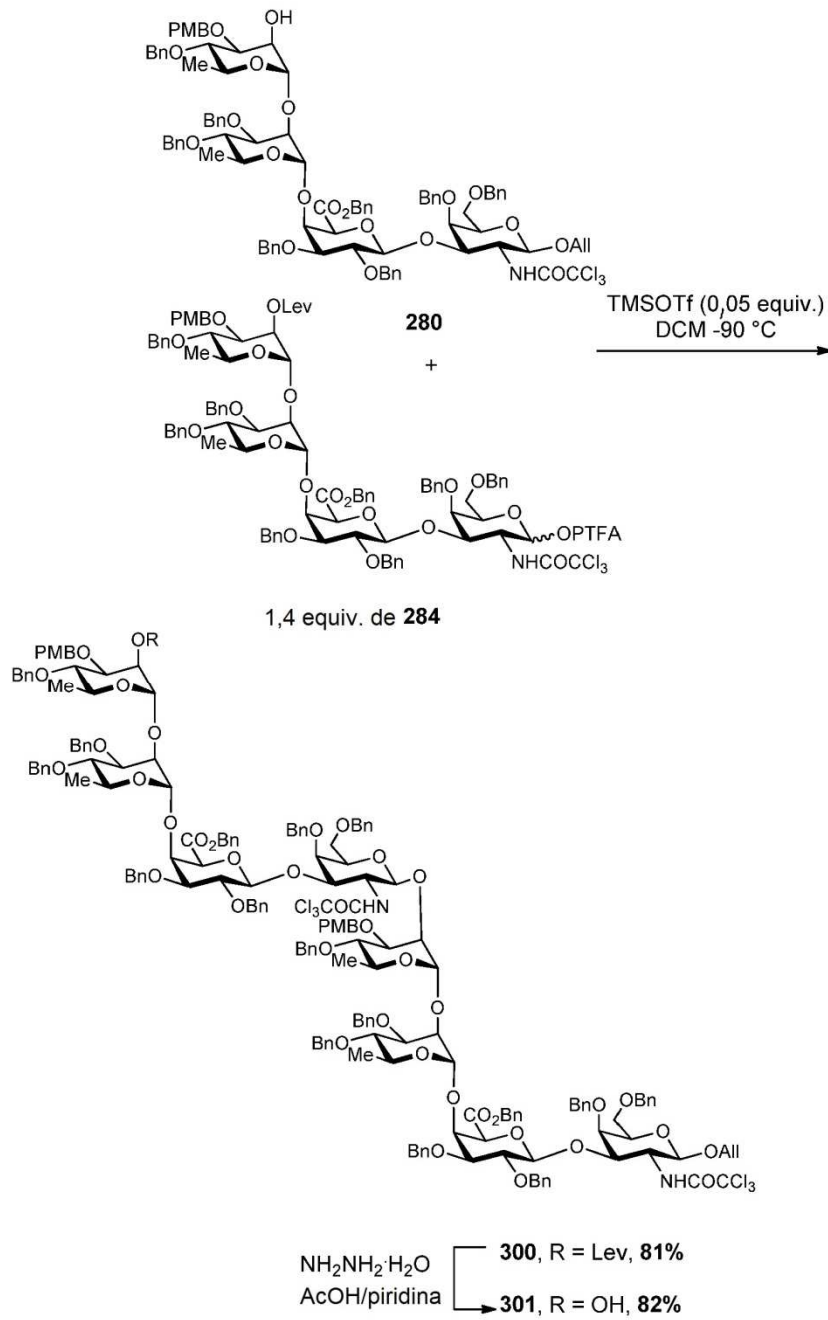


Tabla I (aceptor HO-C (9) es un precursor conocido ^[26])

Como ejemplo teórico que sigue, el octasacárido que lleva un residuo C en el extremo reductor puede prepararse acoplado bloques de construcción aceptores y donantes seleccionados entre aquellos (Ic) enumerados anteriormente (Tabla I). Alternativamente, oligo- o polisacáridos (Ia) que tienen un residuo D en su extremo reductor pueden obtenerse mediante el uso de un conjunto apropiado de donantes (Ic) enumerados en la tabla I en combinación con el acepto HO-CD (48). En este caso, el donante CDAB-PTFA se usa de forma iterativa tantas veces como sea necesario (γ) para alcanzar la longitud de cadena adecuada:

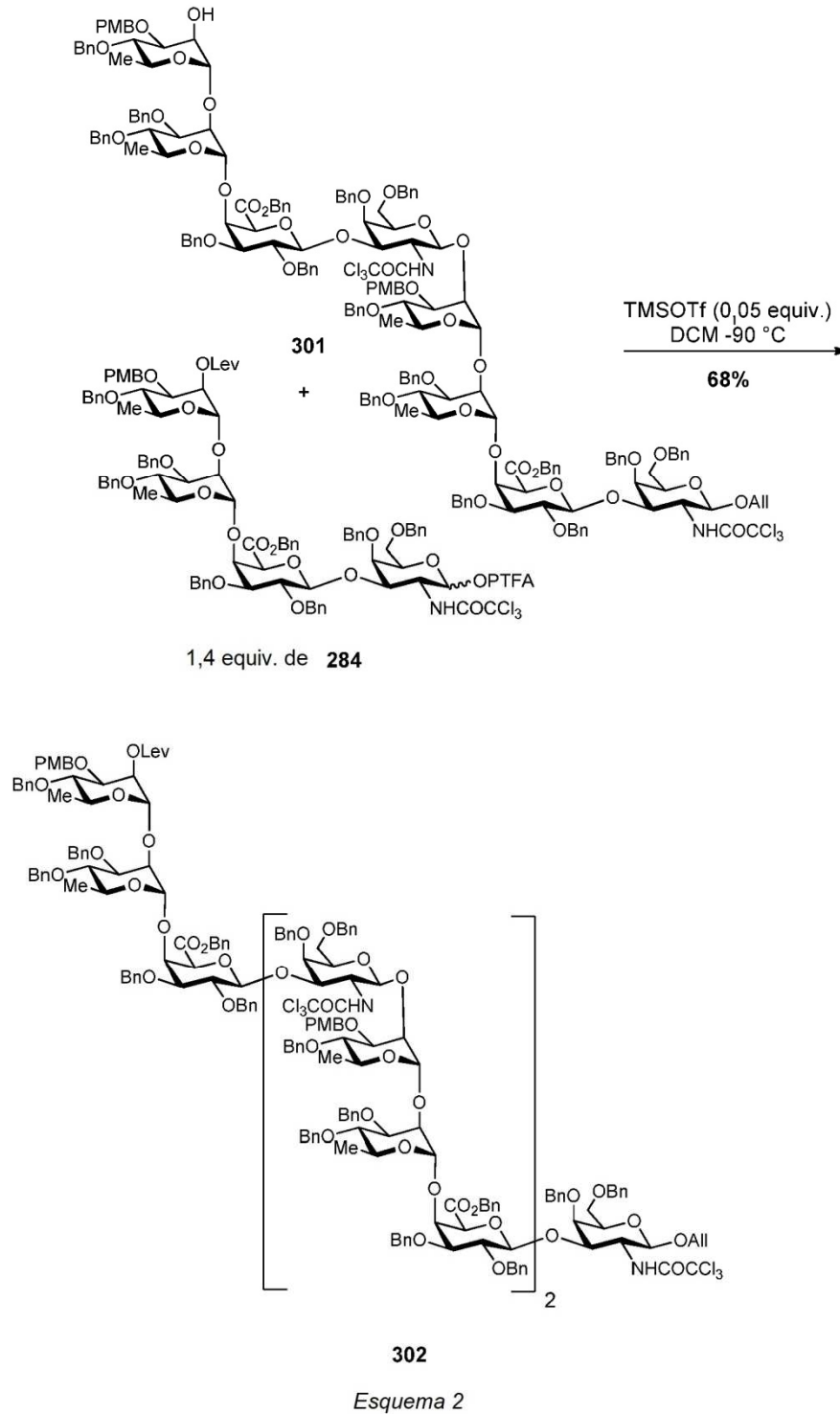


- 10 Como otro ejemplo, el octasacárido $[\text{CDAB}]_2$ (300) puede prepararse según un método que comprende un paso de acoplamiento del acepto de tetrasacárido HO-CDAB (280) con el donante de tetrasacárido CDAB-PTFA (284). Tal método puede ilustrarse mediante el siguiente esquema.

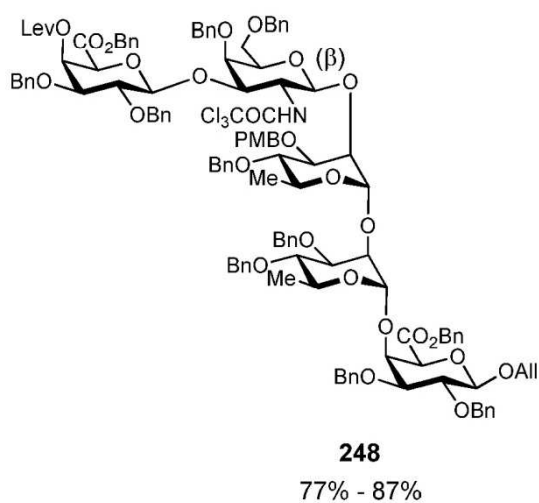
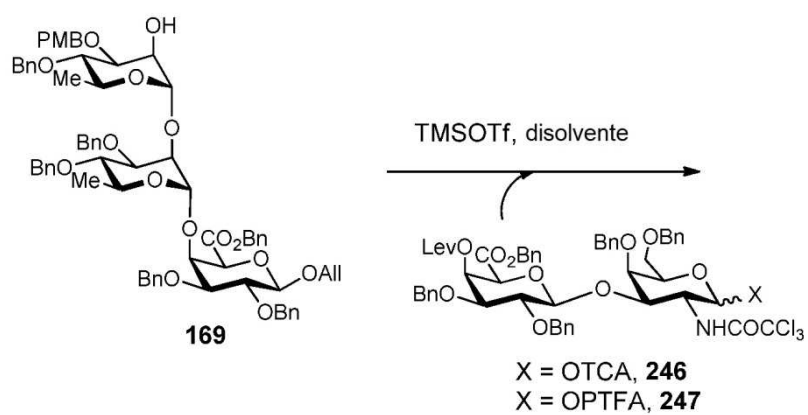


Esquema 1

Como otro ejemplo, el dodecasacárido [CDAB]₃ (302) puede prepararse según un método que comprende un paso de acoplamiento del aceptor de octasacárido HO-[CDAB]₂ (301) con el donante de tetrasacárido CDAB-PTFA (284). Dicho método puede ilustrarse mediante el siguiente esquema.

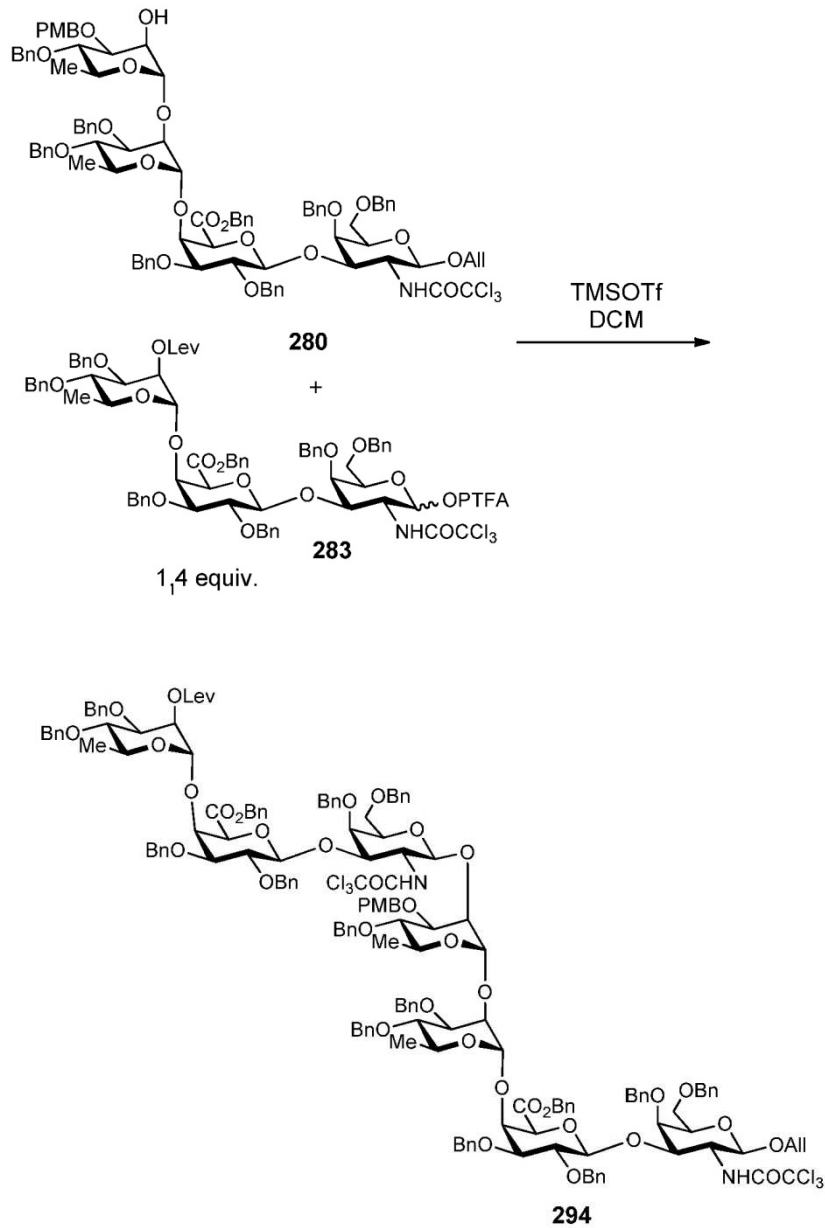


Como otro ejemplo, el pentasacárido ABCDA (248) puede prepararse según un método que comprende un paso de acoplamiento del aceptor de trisacárido HO-CDA (169) con el donante de disacárido AB-TCA (246) o AB-PTFA (247). Dicho método puede ilustrarse mediante el siguiente esquema.



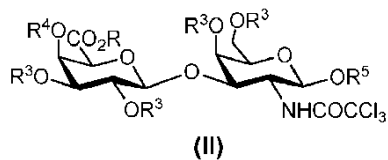
Esquema 3

Como otro ejemplo, el heptasacárido DABCDAB (294) puede prepararse según un método que comprende un paso de acoplamiento del aceptor de tetrasacárido HO-CDAB (280) con el donante de trisacárido DAB-PTFA (283). Dicho método puede ilustrarse mediante el siguiente esquema.



Esquema 4

En otro aspecto, la descripción proporciona un disacárido de fórmula (II) que no forma parte de la presente invención:



en el que:

5 R es un grupo protector de éster, preferentemente escindible por hidrogenólisis, como un bencilo,

R^3 es un grupo protector de hidroxilo permanente, preferentemente un éter bencílico,

R^4 es H o un grupo protector temporal, en particular ortogonal al alilo y un éster bencílico (CO_2Bn), que puede seleccionarse independientemente entre el siguiente conjunto no exhaustivo que consiste en levulinilo, cloroacetilo, benzoilo sustituido, como por ejemplo AZMB, éter de sililo,

R⁵ es alilo, H, *N*-tricloroacetimidoilo (TCA), o

N-feniltrifluoroacetimidoilo (PTFA), siempre que R⁴ y R⁵ no sean H simultáneamente.

Los disacáridos de fórmula (II), en particular los disacáridos 242, 244, 245, 246 y 247 son particularmente ventajosos como intermediarios clave para acceder a los oligo- y polisacáridos (Ib) y (Ia).

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un oligo- o polisacárido (Ib) o (Ic) como se define en el presente documento, como un intermedio para la preparación de un oligo- o polisacárido (Ia) como se define en el presente documento, o de un conjugado como se define anteriormente.

Definiciones

Los siguientes términos y expresiones utilizados en el presente documento tienen los significados indicados.

- 10 "Oligosacárido", como se define en el presente documento, es un carbohidrato que contiene de dos a veinte unidades de monosacárido unidas entre sí, "oligosacárido" se usa en el presente documento de manera liberal para indicar los sacáridos descritos en el presente documento; este uso difiere de la definición estándar de que los oligosacáridos pueden contener hasta diez unidades de monosacáridos inclusive (Joint Commission on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem. 1982, 126, 433-437).

- 15 "Polisacárido", tal como se define en el presente documento, es un carbohidrato que contiene más de veinte subunidades de monosacárido unidas entre sí.

"Extremo reductor", como se define en el presente documento, se refiere al extremo de un oligo- o polisacárido con un carbono anomérico (C₁) que no está involucrado en un enlace glucosídico con otro residuo de azúcar.

- 20 "Vehículo" se refiere a cualquier molécula que se puede unir de forma covalente o no covalente a un oligo- o polisacárido de la invención para formar un glucoconjugado de la invención. Incluye inmunovehículos para uso como vacunas y otros vehículos para preparar reactivos de diagnóstico.

"Inmunovehículo" se refiere a una molécula inmunogénica o un fragmento de una molécula, que es reconocida por las células T colaboradoras y puede contribuir a la respuesta de los anticuerpos al inducir la maduración de la afinidad de los anticuerpos, el cambio de isotipo de IgM a IgG y la memoria de las células B.

- 25 "Otros vehículos para preparar reactivos de diagnóstico" se refiere a agentes comúnmente usados para inmovilizar moléculas en una fase sólida, para generar una presentación multivalente o para marcar moléculas.

"Etiqueta" se refiere a cualquier sustancia que pueda producir una señal que pueda detectarse por cualquier medio apropiado.

"Glucoconjugado" se refiere a un conjugado como se define en el presente documento.

- 30 "Prevención y tratamiento" se refiere a la prevención de infección o reinfección, reducción o eliminación de los síntomas y reducción o eliminación completa del patógeno. El tratamiento puede efectuarse profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección).

- 35 "Alquilo" se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, isoamilo, neopentilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, hexilo, etc.

"Alcoxi" se refiere a un grupo alquilo-O-, en el que el grupo alquilo es como se define en el presente documento.

"Ariilo" se refiere a un sistema de anillo aromático de hidrocarburo mono- o bicíclico que tiene de 6 a 10 átomos de carbono en el anillo. Los ejemplos incluyen fenilo y naftilo.

"Hal" se refiere a un átomo de halógeno, a saber, F, Cl, Br e I.

- 40 Las siguientes abreviaturas utilizadas en el presente documento tienen los significados indicados.

Ac: acetilo

All: alilo

anhid.: anhidro

ac.: acuoso

- 45 Ar: argón

- AW: lavado con ácido
- Bn: bencilo
- calc: calculado
- CAN: nitrato de cerio y amonio
- 5 Chex: ciclohexano
- DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
- DCC: 1,3-diciclohexilcarbodiimida
- DCE: 1,2-dicloroetano
- DCM: diclorometano
- 10 DMAP: *N,N*-dimetilaminopiridina
- ESI: ionización por electropulverización
- h: hora
- HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento
- HRMS: espectrometría de masas de alta resolución
- 15 Lev: levulinoilo
- LC-MS: Espectrometría de masas con cromatografía líquida
- LPS: lipopolisacárido
- Me: metilo
- min: minuto
- 20 MS: tamices moleculares
- RMN: resonancia magnética nuclear
- O-Ag: O-antígeno
- Ph: fenilo
- PMB: *para*-metoxibencilo
- 25 PTFA: *N*-feniltrifluoroacetimidoilo
- Rf: factor de retardo
- Rt: tiempo de retención
- RP: fase inversa
- ta: temperatura ambiente
- 30 SF6: *Shigella flexneri* serotipo 6
- SF6a: *Shigella flexneri* serotipo 6a
- TBAI: bromuro de tetrabutilamonio
- TCA: tricloroacetimidato
- TEMPO: (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxilo
- 35 TFA: ácido trifluoroacético
- THF: tetrahidrofurano
- TLC: cromatografía en capa fina

TMSOTf: trifluorometanosulfonato de trimetilsililo

Tol: tolueno

Otras características de la invención se harán evidentes en el curso de la siguiente descripción de ejemplos de realización. Estos ejemplos se dan para ilustrar la invención y no pretenden ser limitantes de la misma.

5 Ejemplos

I. Síntesis de oligo- y/o polisacáridos

Métodos generales:

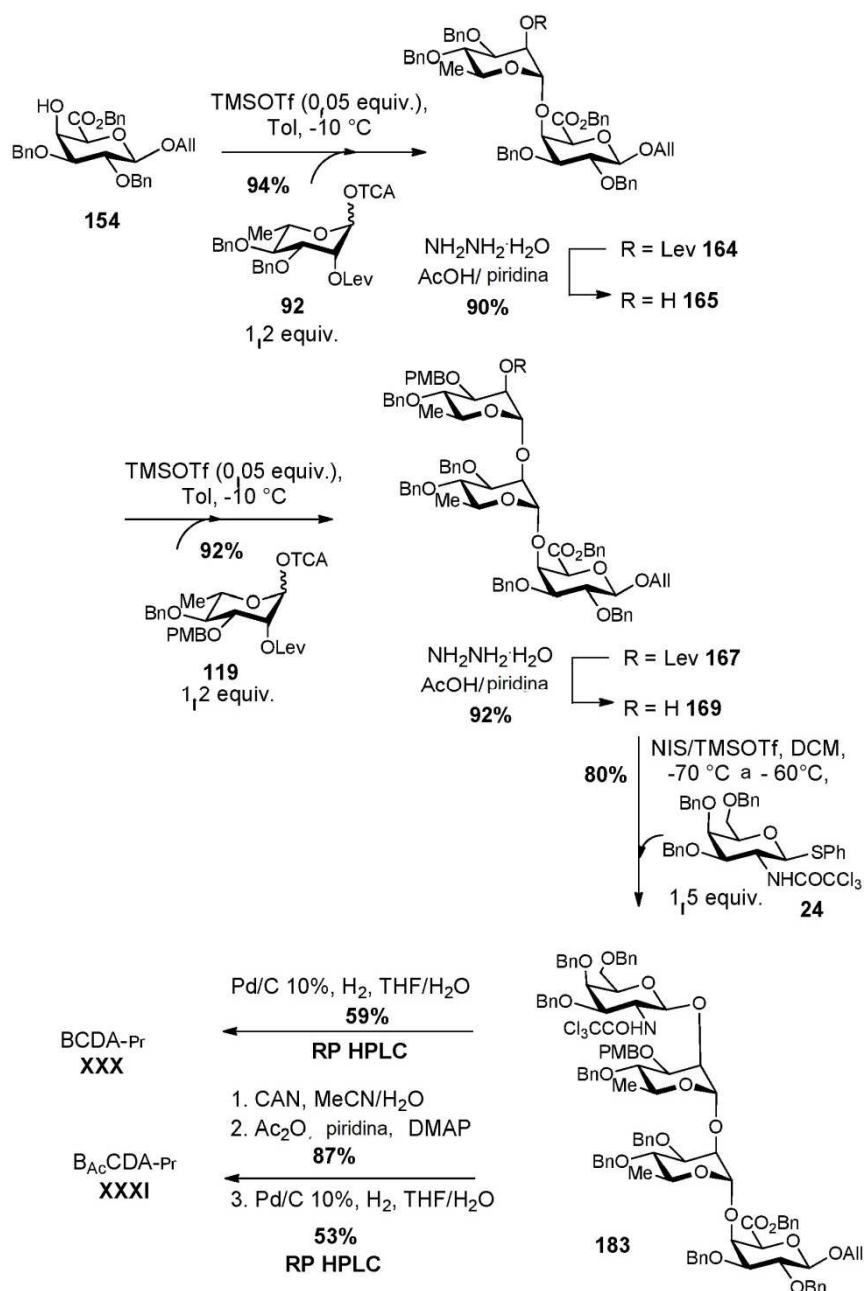
- Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron a 303 K en un espectrómetro Bruker Avance a 400 MHz (^1H) y 100 MHz (^{13}C) equipado con una sonda BBO. Las señales se presentan como m (multiplete), s (singlete), d (doblete), t (triplete), dd (doblete de dobletes), q (cuadruplete), qt (quintuplete), sex (sextuplete), dt (doblete de tripletes), dq (doblete de cuadrupletes), ddd (doblete de doblote de doblote), m (multiplete). Las señales también se pueden describir como amplias (prefijo b), pseudo (prefijo p), superpuestas (sufijo o) o parcialmente superpuestas (sufijo po). Las constantes de acoplamiento se presentan en hercios (Hz). Los desplazamientos químicos se presentan en ppm (δ) en relación con el pico de disolvente residual. De los dos protones geminales magnéticamente no equivalentes en C-6, el que resuena en el campo más bajo se indica como H-6a, y el que está en el campo más alto se indica como H-6b. Las asignaciones intercambiables están marcadas con un asterisco. Los residuos de azúcar se rotulan de acuerdo con las letras de la unidad de repetición del O-Ag (A, B, C y D) de SF6 y se identifican con un subíndice en la lista de asignaciones de señal. Para los oligosacáridos más grandes que una unidad de repetición, las letras A, B, C, D se convierten en A', B', C', D' y A'', B'', C'', D'', comenzando con A, B, C, D desde el extremo reductor.
- Los espectros HRMS se registraron en un instrumento WATERS QTOF Micromass en el modo de ionización por electropulverización de iones positivos (ESI⁺). Las soluciones se prepararon utilizando MeCN/H₂O 1:1 que contiene 0,1% de ácido fórmico.

- Los análisis de RP-HPLC analítica de los compuestos finales se realizaron en un instrumento Agilent 1200 Series equipado con un detector UV ($\lambda = 215 \text{ nm}$) y una columna analítica Symmetry de $3,5 \mu\text{m C}_{18} 100 \text{ \AA } 2,1 \times 100 \text{ mm}$ eluyendo con un gradiente lineal de 0-35 % de MeCN en TFA ac. 0,01 N durante 20 min a un caudal de $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

A. Estrategia sintética lineal

- La síntesis lineal representa un proceso mediante el cual la elongación de la cadena necesaria para obtener el objetivo del oligo- o polisacárido implica la glucosilación ordenada predeterminada de un aceptor con un residuo a la vez, alternando con el desenmascaramiento selectivo del sitio de glucosilación posterior dentro del residuo recién introducido.

Ejemplo de una síntesis lineal: acceso a tetrasacáridos BCDA-Pr (XXX) y B_{Ac}CDA-Pr (XXXI)



Esquema 5

El aceptor de galacturonato 154 (A) se glucosila primero con el donante de tricloroacetimidato de ramnosilo 92 (D) para dar el disacárido completamente protegido 164. El sitio de elongación se desprotege selectivamente, convirtiendo a este disacárido en un aceptor (165). El 165 recién sintetizado se hace reaccionar, en condiciones seleccionadas de glucosilación basadas en imidato, con un segundo donante de ramnosilo 119 que es un precursor del residuo C. Curiosamente, su 3-OH está protegido ortogonalmente en forma de un *para*-metoxibenciléter. La hidrazinólisis del éster de levulinilo único del trisacárido resultante permitió el desenmascaramiento selectivo del 2c-OH, convirtiendo así el producto de glucosilación 167 en el aceptor 169. La glucosilación del trisacárido 169 con el residuo de galactosaminilo 24 (B), en este caso un donante de tioglucósido, proporcionó el producto de glucosilación unido en β 183 según sea necesario. El tetrasacárido completamente protegido 183 se sometió a un proceso de dos pasos que involucraba primero la escisión oxidativa del éter PMB y luego la acetilación del así desenmascarado 3c-OH para dar el análogo 3-OAc 187. El tratamiento de tetrasacáridos 183 y 187 con Pd/C en una atmósfera de hidrógeno condujo a los glucósidos de propilo XXX y XXXI, emitido a partir de la hidrogenólisis del éster bencílico, bencilo y cuando sea necesario *para*-metoxibenciléteres en concomitancia con la reducción de tricloroacetamida a acetamida y alilo a

propilo. El tetrasacárido XXX y su análogo 3c-OAc XXXI son imitaciones sintéticas con cambio de marco de la unidad de repetición biológica de O-antígenos de SF6, SF6a y/o *E. coli* 0147.

Bencil (3,4-di-O-bencil-2-O-levulinoil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(alil 2,3-di-O-bencil- β -D-galactopiranosid)uronato (164).

- 5 Una suspensión del aceptor 154^[27] (300 mg, 595 μ moles), tricloroacetimidato 92^[28] (419 mg, 713 μ moles) y MS 300 AW de 4Å recién activado (450 mg) en tolueno anhid. (5,9 ml) se agitó durante 1 h a ta en atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se enfrió a -10°C y se añadió TMSOTf (5 μ l, 30 μ moles). La mezcla de reacción se agitó a esa temperatura durante 30 min. La reacción se inactivó añadiendo Et₃N. La mezcla resultante se filtró y el filtrado se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/Acetona 97:3 a 96:4) para dar el disacárido 164 (519 mg, 94%) como un aceite blanco.

¹H RMN (CDCl₃), δ 7,41-7,23 (m, 25H, H_{Ar}), 5,99 (m, 1H, CH=AlI), 5,55 (dd, 1H, $J_{1,2} = 2,1$ Hz, $J_{2,3} = 3,3$ Hz, H-2D), 5,36 (m, 1H, $J_{trans} = 17,2$ Hz, $J_{gem} = 1,5$ Hz, =CH₂AlI), 5,28 (d, 1H, $J = 12,3$ Hz, H_{CO2Bn}), 5,24-5,20 (m, 2H, H-1D, =CH₂AlI), 5,12 (d, 1H, H_{CO2Bn}), 4,94 (d, 1H, $J = 11,0$ Hz, H_{Bn}), 4,91 (d, 1H, $J = 11,2$ Hz, H_{Bn}), 4,79 (d, 1H, $J = 11,0$ Hz, H_{Bn}), 4,77 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, H_{Bn}), 4,74 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, H_{Bn}), 4,64 (d, 1H, $J = 11,1$ Hz, H_{Bn}), 4,61 (d, 1H, $J = 11,2$ Hz, H_{Bn}), 4,50 (m, 1H, H_{AlI}), 4,45 (d, 1H, $J = 11,0$ Hz, H_{Bn}), 4,43-4,39 (m, 2H, H-4A, H-1A), 4,17 (m, 1H, H_{AlI}), 4,05 (bs, 1H, H-5A), 3,88 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9,4$ Hz, H-3D), 3,80-3,71 (m, 2H, H-2A, H-5D), 3,56 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9,7$ Hz, $J_{3,4} = 2,9$ Hz, H-3A), 3,37 (pt, 1H, $J_{4,5} = 9,4$ Hz, H-4D), 2,72-2,62 (m, 4H, CH_{2lev}), 2,16 (s, 3H, CH_{3lev}), 1,30 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D).

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 206,4 (CO_{lev}), 171,6 (CO_{2lev}), 167,4 (C-6A), 102,6 (C-1A, $^1J_{CH} = 161,3$ Hz), 98,9 (C-1D, $^1J_{CH} = 172,7$ Hz), 67,4 (C_{CO2Bn}), 38,1 (COCH_{2lev}), 29,9 (CH_{3lev}), 28,2 (CO₂CH_{2lev}).

20 HRMS (ESI⁺): m/z 951,3846 (calculado para C₅₅H₆₀O₁₃Na [M+Na]⁺: m/z 951,3932).

Bencil (3,4-di-O-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(alil 2,3-di-O-bencil- β -D-galactopiranosid)uronato (165).

- A una solución de disacárido 164 (1,25 g, 1,35 mmoles) en piridina seca (8,3 ml) agitada a 0°C en atmósfera de Ar, se añadió lentamente ácido acético (5,6 ml) seguido de monohidrato de hidrazina (326 μ l, 6,73 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 1,5 h. Los compuestos volátiles se evaporaron y co-evaporaron dos veces con tolueno. El residuo se recogió en DCM y se lavó con agua. La fase ac. se volvió a extraer dos veces con DCM y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se pasaron a través de un filtro separador de fases y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 8:2 a 7:3) para dar alcohol 165 (1,05 g, 90%) como un aceite de color amarillo claro.

¹H RMN (CDCl₃), δ 7,42-7,27 (m, 25H, H_{Ar}), 6,01 (m, 1H, CH=AlI), 5,39 (do, 1H, $J_{1,2} = 1,7$ Hz, H-1D), 5,38 (m, 1H, $J_{trans} = 17,2$ Hz, $J_{gem} = 1,6$ Hz, =CH₂AlI), 5,32 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, H_{CO2Bn}), 5,25 (m, 1H, $J_{cis} = 10,5$ Hz, =CH₂AlI), 5,14 (d, 1H, H_{CO2Bn}), 4,96 (d, 1H, $J = 11,0$ Hz, H_{Bn}), 4,90 (d, 1H, $J = 11,3$ Hz, H_{Bn}), 4,80 (d_{po}, 1H, $J = 11,9$ Hz, H_{Bn}), 4,76 (d_{po}, 1H, $J = 10,9$ Hz, H_{Bn}), 4,75 (d_{po}, 1H, $J = 11,9$ Hz, H_{Bn}), 4,67-4,64 (m, 3H, H_{Bn}), 4,54 (m, 1H, H_{AlI}), 4,49 (dd, 1H, H-4A), 4,43 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,8$ Hz, H-1A), 4,23-4,16 (m, 2H, H-2D, H_{AlI}), 4,08 (d, 1H, $J_{4,5} = 1,2$ Hz, H-5A), 3,89 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,2$ Hz, $J_{3,4} = 9,0$ Hz, H-3D), 3,80-3,71 (m, 2H, H-2A, H-5D), 3,58 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9,8$ Hz, $J_{3,4} = 3,0$ Hz, H-3A), 3,47 (pt, 1H, $J_{4,5} = 9,3$ Hz, H-4D), 2,43 (bs, 1H, OH), 1,32 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D).

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 167,3 (C-6A), 102,7 (C-1A, $^1J_{CH} = 159,4$ Hz), 100,4 (C-1D, $^1J_{CH} = 172,7$ Hz), 67,3 (C_{CO2Bn}).

HRMS (ESI⁺): m/z 853,3478 (calculado para C₅₀H₅₄O₁₁Na [M+Na]⁺: m/z 853,3564).

bencil (4-O-bencil-3-O-para-metoxibencil-2-O-levulinoil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-O-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(alil 2,3-di-O-bencil- β -D-galactopiranosid)uronato (167).

- 40 Una mezcla de aceptor 165 (300 mg, 361 μ moles), tricloroacetimidato 119 (267 mg, 433 μ moles) y MS en polvo de 4Å recién activado (750 mg) en tolueno anhid. (10,8 ml) se agitó durante 1 h a ta en atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se enfrió a -10°C y se añadió TMSOTf (3,3 μ l, 18 μ moles). La mezcla de reacción se agitó a esa temperatura durante 20 min. La reacción se inactivó añadiendo Et₃N. La suspensión resultante se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 95:5 a 85:15) para dar el trisacárido 167 (426 mg, 91%) como un aceite de color amarillo claro.

¹H RMN (CDCl₃), δ 7,43-7,17 (m, 32H, H_{Ar}), 6,86 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H_{ArPMB}), 5,99 (m, 1H, CH=AlI), 5,52 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1,9$ Hz, $J_{2,3} = 3,1$ Hz, H-2C), 5,36 (m, 1H, $J_{trans} = 17,2$ Hz, $J_{gem} = 1,6$ Hz, =CH₂AlI), 5,33 (bs_o, 1H, H-1D), 5,27 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, H_{CO2Bn}), 5,22 (m, 1H, $J_{cis} = 10,5$ Hz, =CH₂AlI), 5,12 (d, 1H, H_{CO2Bn}), 4,94 (d_{po}, 1H, $J = 11,1$ Hz, H_{Bn}), 4,92-4,88 (m_o, 3H, H-1C, 2H_{Bn}), 4,80 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, H_{Bn}), 4,75 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, H_{Bn}), 4,70-4,57 (m, 6H, H_{Bn}), 4,50 (m_{po}, 1H, H_{AlI}), 4,48 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz, H_{Bn}), 4,39 (m_o, 1H, H-4A), 4,38 (do, 1H, $J_{1,2} = 7,8$ Hz, H-1A), 4,17 (m, 1H, H_{AlI}), 4,11 (pt, 1H, H-2D), 4,02 (d, 1H, $J_{4,5} = 1,0$ Hz, H-5A), 3,94 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-3C), 3,86 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 2,9$ Hz, $J_{3,4} = 9,4$ Hz, H-3D), 3,82 (dq, 1H, H-5C), 3,78 (s, 3H, CH_{3PMB}), 3,75-3,64 (m, 2H, H-2A, H-5D), 3,51 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9,8$ Hz, $J_{3,4} = 2,8$ Hz, H-3A), 3,42 (pt, 1H, $J_{4,5} = 9,5$ Hz, H-4D), 3,37 (pt, 1H, $J_{4,5} = 9,5$ Hz, H-4C), 2,77-2,66 (m, 4H, CH_{2lev}), 2,18 (s, 3H, CH_{3lev}), 1,28 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D), 1,20 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6C).

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 206,1 (CO_{lev}), 171,7 (CO_{2lev}), 167,3 (C-6A), 159,2 (C_{IVPMB}), 113,7 (2C, C_{ArPMB}), 102,7 (C-1A, ¹J_{CH} = 157,6 Hz), 100,0 (C-1D, ¹J_{CH} = 178,6 Hz), 99,2 (C-1C, ¹J_{CH} = 171,6 Hz), 67,3 (C_{CO2Bn}), 55,1 (CH_{3PMB}), 38,2 (COCH_{2lev}), 29,8 (CH_{3lev}), 28,3 (CO₂CH_{2lev}).

HRMS (ESI⁺): *m/z* 1307,5554 (calculado para C₇₆H₈₄O₁₈Na [M+Na]⁺: *m/z* 1307,5555).

- 5 bencil (4-*O*-bencil-3-*O*-para-metoxibencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-*O*-bencilo-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(alil 2,3-di-*O*-bencil-β-D-galactopiranosid)uronato (169).

Se añadió lentamente ácido acético (11,3 ml) seguido de monohidrato de hidracina (492 µl, 10,1 mmoles) a una solución del compuesto completamente protegido 167 (2,60 g, 2,0 mmoles) en piridina seca (16,8 ml) agitada a 0°C en atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se agitó a ta durante 30 min. Los compuestos volátiles se evaporaron y co-evaporaron dos veces con tolueno. El residuo se recogió en DCM y se lavó con agua. La fase ac. se volvió a extraer dos veces con DCM y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se pasaron a través de un filtro separador de fases y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 9:1 a 7:3) para dar alcohol 169 (2,23 g, 93%) como una espuma blanca.

- 15 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,45-7,16 (m, 32H, H_{Ar}), 6,89 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, H_{ArPMB}), 6,00 (m, 1H, CH=Alil), 5,37 (m, 1H, *J*_{trans} = 17,3 Hz, *J*_{gem} = 1,6 Hz, =CH₂Alil), 5,35 (bs_o, 1H, H-1D), 5,28 (d, 1H, *J* = 12,1 Hz, H_{CO2Bn}), 5,23 (m, 1H, *J*_{cis} = 10,5 Hz, =CH₂Alil), 5,13 (d, 1H, H_{CO2Bn}), 5,02 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1,4 Hz, H-1C), 4,94 (d_{po}, 1H, *J* = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,90 (d_{po}, 1H, *J* = 11,2 Hz, H_{Bn}), 4,89 (d_{po}, 1H, *J* = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,81 (d, 1H, *J* = 12,1 Hz, H_{Bn}), 4,75 (d, 1H, *J* = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,70-4,59 (m, 7H, H_{Bn}), 4,51 (m, 1H, H_{Alil}), 4,40 (m_o, 1H, H-4A), 4,39 (d_o, 1H, *J*_{1,2} = 7,7 Hz, H-1A), 4,17 (m_{po}, 1H, H_{Alil}), 4,15 (m_o, 1H, H-2D), 4,12 (m, 1H, H-2C), 4,03 (d, 1H, *J*_{4,5} = 0,9 Hz, H-5A), 3,91-3,86 (m, 2H, H-3C, H-3D), 3,84 (dq_{po}, 1H, H-5C), 3,79 (s, 3H, CH_{3PMB}), 3,76-3,66 (m, 2H, H-2A, H-5D), 3,52 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 9,8 Hz, *J*_{3,4} = 2,8 Hz, H-3A), 3,45 (pt_{po}, 1H, *J*_{4,5} = 9,5 Hz, H-4C), 3,41 (pt, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9,6 Hz, H-4D), 1,30 (d, 3H, *J*_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D), 1,21 (d, 3H, *J*_{5,6} = 6,2 Hz, H-6C).

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 167,3 (C-6A), 159,2 (C_{IVPMB}), 114,0 (2C, C_{ArPMB}), 102,7 (C-1A, ¹J_{CH} = 161,1 Hz), 100,8 (C-1D, ¹J_{CH} = 169,0 Hz), 100,2 (C-1C, ¹J_{CH} = 171,9 Hz), 67,3 (C_{CO2Bn}), 55,2 (CH_{3PMB}).

- 25 HRMS (ESI⁺): *m/z* 1210,5117 (calculado para C₇₁H₇₈O₁₆Na [M+Na]⁺: *m/z* 1210,5222), *m/z* 613,2374 (calculado para C₇₁H₇₉O₁₆K [M+H+K]²⁺: *m/z* 613,2502).

Bencil (3,4,6-tri-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosil)-(1→2)-(4-*O*-bencil-3-*O*-para-metoxibencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-*O*-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(alil 2,3-di-*O*-bencil-β-D-galactopiranosid)uronato (183).

- 30 Una mezcla de aceptor 169 (300 mg, 253 µmoles), donante de tioglucósido 24 (260 mg, 379 µmoles), y MS en polvo de 4Å recién activado (750 mg) en DCM anhid. (2,9 ml) se agitó durante 1 h a ta en atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se enfrió a -78°C, luego se añadieron NIS (114 mg, 505 µmoles) y TMSOTf (4,6 µL, 25 µmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min permitiendo que el baño alcanzara -60°C. Un control en TLC (Tol/EtOAc 9:1) indicó la ausencia de aceptor 169 (rf = 0,18) y la presencia de un nuevo producto menos polar (rf = 0,38). La reacción se inactivó mediante la adición de Et₃N. La suspensión resultante se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 98:2 a 92:8) para dar el tetrasacárido 183 (356 mg, 80%) como una espuma blanca.

- 40 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,41-7,05 (m, 47H, H_{Ar}), 6,91 (d, 1H, *J*_{NH,2} = 7,5 Hz, NH), 6,83 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, H_{ArPMB}), 5,97 (m, 1H, CH=Alil), 5,35 (m, 1H, *J*_{trans} = 17,3 Hz, *J*_{gem} = 1,6 Hz, =CH₂Alil), 5,26 (bs, 1H, H-1D), 5,25 (d_{po}, 1H, H_{CO2Bn}), 5,21 (m, 1H, *J*_{cis} = 10,5 Hz, =CH₂Alil), 5,10 (d, 1H, *J* = 12,2 Hz, H_{CO2Bn}), 4,98-4,92 (m, 4H, H-1B, H-1C, 2H_{Bn}), 4,90 (d_{po}, 1H, *J* = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,84 (d_{po}, 1H, *J* = 11,1 Hz, H_{Bn}), 4,76 (d, 1H, *J* = 12,1 Hz, H_{Bn}), 4,72 (d_{po}, 1H, *J* = 10,5 Hz, H_{Bn}), 4,71-4,67 (m, 2H, H_{Bn}), 4,65-4,55 (m, 3H, H_{Bn}), 4,58-4,45 (m, 6H, 5H_{Bn}, H_{Alil}), 4,36 (d_o, 1H, *J*_{1,2} = 7,7 Hz, H-1A), 4,34 (bd_o, 1H, H-4A), 4,27 (d, 1H, *J* = 11,6 Hz, H_{Bn}), 4,22 (d, 1H, *J* = 11,6 Hz, H_{Bn}), 4,18-4,10 (m, 2H, H-2B, H_{Alil}), 4,08 (pt, 1H, H-2C), 4,03-3,96 (m, 4H, H-5A, H-3B, H-4B, H-2D), 3,87 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 3,0 Hz, *J*_{3,4} = 9,6 Hz, H-3C), 3,81 (dd_{po}, 1H, *J*_{2,3} = 3,0 Hz, *J*_{3,4} = 9,5 Hz, H-3D), 3,79 (dq_{po}, 1H, H-5C), 3,71 (s, 3H, CH_{3PMB}), 3,70-3,59 (m, 3H, H-2A, H-6aB, H-5D), 3,51-3,42 (m, 3H, H-3A, H-5B, H-4C), 3,34 (pt_{po}, 1H, *J*_{4,5} = 9,2 Hz, H-4D), 3,31 (m_o, 1H, H-6bB), 1,28 (d, 3H, *J*_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D), 1,18 (d, 3H, *J*_{5,6} = 6,2 Hz, H-6C).

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 167,3 (C-6A), 161,6 (NHCO), 159,4 (C_{IVPMB}), 113,9 (2C, C_{ArPMB}), 102,7 (C-1A, ¹J_{CH} = 162,0 Hz), 101,3 (C-1C, ¹J_{CH} = 173,5 Hz), 100,7 (C-1B, ¹J_{CH} = 162,4 Hz), 100,4 (C-1D, ¹J_{CH} = 175,4 Hz), 92,9 (C_{Cl3}), 67,3 (C_{CO2Bn}), 55,2 (CH_{3PMB}).

- 50 HRMS (ESI⁺): *m/z* 1784,6198 (calculado para C₁₀₀H₁₀₆Cl₃NO₂₁Na[M+Na]⁺: *m/z* 1784,6221).

Bencil (3,4,6-tri-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosil)-(1→2)-(3-*O*-acetil-4-*O*-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-*O*-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(alil 2,3-di-*O*-bencil-β-D-galactopiranosid)uronato (187).

- 55 Se añadieron agua (1,6 ml) y CAN (870 mg, 1,59 mmoles) a una solución de tetrasacárido 183 (700 mg, 397 µmoles) en MeCN (15,9 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 30 min. La reacción se inactivó con NaHCO₃ ac. sat.

La mezcla de reacción se diluyó con agua y DCM y la fase ac. se extrajo tres veces con DCM. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se pasaron a través de un filtro separador de fases y se concentraron. El aceite en bruto resultante se disolvió en piridina (20 ml) y se añadieron anhídrido acético en exceso (3,75 ml) y DMAP (48 mg, 397 μ moles) a la solución mantenida con agitación a ta. Los compuestos volátiles se evaporaron y co-evaporaron tres veces con tolueno. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Tol/ET/OAc 95:5 a 9:1) para proporcionar el tetrasacárido monoacetilado. 187 (582 mg, 87% en dos pasos) como una espuma blanca.

^1H RMN (CDCl_3), δ 7,41-7,04 (m, 45H, H_{Ar}), 7,02 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 7,0$ Hz, NH), 5,98 (m, 1H, $\text{CH}=\text{AlI}$), 5,36 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 3,1$ Hz, H-3c), 5,35 (m, 1H, $J_{\text{gem}} = 1,6$ Hz, $=\text{CH}_2\text{AlI}$), 5,32 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,6$ Hz, H-1_D), 5,26 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz $\text{H}_{\text{CO}_2\text{Bn}}$), 5,22 (m, 1H, $J_{\text{cis}} = 10,5$ Hz, $=\text{CH}_2\text{AlI}$), 5,09 (d, 1H, $\text{H}_{\text{CO}_2\text{Bn}}$), 5,03 (d_{po}, 1H, $J_{1,2} = 8,4$ Hz, H-1_B), 5,01 (d_{po}, 1H, $J_{1,2} = 2,0$ Hz, H-1_C), 4,89 (d_{po}, 1H, $J = 10,8$ Hz, H_{Bn}), 4,88 (d, 2H, $J = 11,1$ Hz, 2H_{Bn}), 4,77 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, H_{Bn}), 4,70 (d, 2H, $J = 11,2$ Hz, H_{Bn}), 4,66 (d, 1H, $J = 11,2$ Hz, H_{Bn}), 4,62-4,52 (m_{po}, 7H, H_{Bn}), 4,50 (m_{po}, 1H, H_{AlI}), 4,40-4,35 (m, 4H, H-1_A, H-4_A, H-3_B, H-2_C), 4,26 (d, 1H, $J = 11,6$ Hz, H_{Bn}), 4,20 (d, 1H, $J = 11,6$ Hz, H_{Bn}), 4,16 (m, 1H, H_{AlI}), 4,05 (d, 1H, $J_{3,4} = 2,4$ Hz, H-4_B), 4,01 (d, 1H, $J_{4,5} = 0,9$ Hz, H-5_A), 4,00 (m, 1H, H-2_D), 3,92-3,82 (m, 2H, H-2_B, H-5_C), 3,80 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2,9$ Hz, $J_{3,4} = 9,5$ Hz, H-3_D), 3,70-3,58 (m, 3H, H-2_A, H-6_{AB}, H-5_D), 3,56-3,47 (m, 4H, H-3_A, H-5_B, H-4_C, H-4_D), 3,35 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 4,5$ Hz, $J_{6a,6b} = 8,3$ Hz, H-6_{BB}), 2,17 (s, 3H, H_{Ac}), 1,29 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6_D), 1,14 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6_C).

^{13}C RMN (CDCl_3) parcial, δ 170,7 (CO_{Ac}) 167,2 (C-6_A), 161,5 (NHCO), 102,6 (C-1_A, $^1J_{\text{CH}} = 156,6$ Hz), 101,3 (C-1_C, $^1J_{\text{CH}} = 176,3$ Hz), 100,0 (C-1_D, $^1J_{\text{CH}} = 171,1$ Hz), 99,6 (C-1_B, $^1J_{\text{CH}} = 163,3$ Hz), 92,9 (CCl_3), 67,3 ($\text{C}_{\text{CO}_2\text{Bn}}$), 21,3 (CH_3Ac).

HRMS (ESI⁺): m/z 1684,5983 (calculado para $\text{C}_{94}\text{H}_{101}\text{Cl}_3\text{NO}_{21}$ [$\text{M}+\text{H}$]⁺: m/z 1684,5931), m/z 1706,5928 (calculado para $\text{C}_{94}\text{H}_{100}\text{Cl}_3\text{NO}_{21}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: m/z 1706,5751).

Propil 2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- ácido β -D-galactopiranosidurónico (XXX).

A una solución agitada de tetrasacárido 183 (254 mg, 140 μ moles) en THF/ H_2O (4:1, 10,2 ml), se añadió Pd al 10%/C (200 mg). La suspensión se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 2 días. Después de este tiempo, el análisis de MS indicó un único peso molecular correspondiente al del tetrasacárido objetivo. La mezcla de reacción se filtró. Evaporación de los compuestos volátiles, suministro de liofilización y purificación del material en bruto mediante RP-HPLC preparativa (columna semipreparativa Kromasil 5 μm C18 100 \AA 10 \times 250 mm, 0-20% de gradiente lineal de CH_3CN en 0,08% de TFA ac. durante 20 min a un caudal de 5,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) dio el tetrasacárido XXX (61,8 mg, 59%) como un sólido blanco después de liofilización repetida.

^1H RMN (D_2O), δ 5,24 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,4$ Hz, H-1_D), 5,08 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,5$ Hz, H-1_C), 4,55 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,4$ Hz, H-1_B), 4,38 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,0$ Hz, H-1_A), 4,35 (d, 1H, $J_{4,5} = 1,2$ Hz, H-5_A), 4,27 (dd, 1H, $J_{3,4} = 2,8$ Hz, H-4_A), 4,05 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,0$ Hz, H-2_C), 4,02 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,1$ Hz, H-2_D), 3,87-3,74 (m, 6H, H-4_B, OCH_2Pr , H-2_B, H-3_A, H-3_D, H-3_C), 3,74-3,63 (m, 3H, H-6_{AB}, H-6_{BB}, H-3_B), 3,63-3,51 (m, 4H, H-5_B, H-5_C, OCH_2Pr , H-5_D), 3,50 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9,9$ Hz, H-2_A), 3,34 (pt, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,8$ Hz, H-4_D), 3,27 (pt, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,7$ Hz, H-4_C), 1,97 (s, 3H, CH_3NHAc), 1,57 (sex, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH_2Pr), 1,20-1,15 (m, 6H, H-6_C, H-6_D), 0,84 (t, 3H, CH_3Pr).

^{13}C RMN (D_2O), δ 175,1 (NHCO), 171,6 (C-6_A), 103,1 (C-1_B, $^1J_{\text{CH}} = 163,2$ Hz), 102,3 (C-1_A, $^1J_{\text{CH}} = 161,7$ Hz), 101,0 (C-1_C, $^1J_{\text{CH}} = 175,8$ Hz), 99,9 (C-1_D, $^1J_{\text{CH}} = 174,7$ Hz), 78,6 (C-2_C), 78,5 (C-2_D), 76,7 (C-4_A), 75,0 (C-5_B), 72,9 (C-3_A), 72,8 (C-5_A), 72,3 (2C, C-4_C, OCH_2Pr), 71,9 (C-4_D), 70,8 (C-3_B), 70,2 (C-2_A), 69,7 (2C, C-3_D, C-3_C), 69,2 (C-5_D), 69,1 (C-5_C), 67,7 (C-4_B), 60,9 (C-6_B), 52,8 (C-2_B), 22,0 (2C, CH_2Pr , CH_3NHAc), 16,6 (2C, C-6_D, C-6_C), 9,6 (CH_3Pr).

HRMS (ESI⁺): m/z 754,2722 (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{NO}_{20}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: m/z 754,2745). RP-HPLC (215 nm): $R_t = 8,5$ min.

Propil 2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(3-*O*-acetil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- ácido β -D-galactopiranosidurónico (XXXI).

A una solución agitada de tetrasacárido 187 (187 mg, 110 μ moles) en THF/ H_2O (4:1, 8,4 ml), se añadió Pd al 10%/C (150 mg). La suspensión se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 2 días. Después de este tiempo, el análisis de MS indicó un peso molecular correspondiente al del tetrasacárido objetivo. La mezcla de reacción se filtró. La evaporación de los compuestos volátiles, liofilización y purificación mediante RP-HPLC preparativa (columna semipreparativa Kromasil 5 μm C18 100 \AA 10 \times 250 mm, gradiente lineal de 0-20% de CH_3CN en TFA acuoso al 0,08% durante 20 min a una caudal de 5,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) dio el tetrasacárido XXXI (45,3 mg, 53%) como un sólido blanco después de liofilización repetida.

^1H RMN (D_2O), δ 5,23 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,3$ Hz, H-1_D), 5,03 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,7$ Hz, H-1_C), 4,92 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,0$ Hz, $J_{3,4} = 10,0$ Hz, H-3_C), 4,33 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,0$ Hz, H-1_A), 4,31 (bs_o, 1H, H-5_A), 4,30 (d_{po}, 1H, $J_{1,2} = 8,3$ Hz, H-1_B), 4,22 (dd, 1H, $J_{3,4} = 2,8$ Hz, $J_{4,5} = 1,1$ Hz, H-4_A), 4,12 (pt, 1H, H-2_C), 3,99 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,1$ Hz, H-2_D), 3,83-3,70 (m, 5H, H-4_B, OCH_2Pr , H-2_B, H-3_A, H-3_D), 3,70-3,57 (m, 4H, H-5_C, H-6_{AB}, H-6_{BB}, H-3_B), 3,52-3,46 (m, 3H, H-5_B, OCH_2Pr , H-5_D), 3,45 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 10,0$ Hz, H-2_A), 3,34 (pt_{po}, 1H, $J = 9,3$ Hz, $J = 9,8$ Hz, H-4_C), 3,35 (pt_{po}, 1H, $J = 9,6$ Hz, $J = 9,8$ Hz, H-4_D), 2,09 (s, 3H, CH_3Ac), 1,97 (s, 3H, CH_3NHAc), 1,56 (sex, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH_2Pr), 1,16 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,3$ Hz, H-6_D), 1,14 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6_C), 0,80 (t, 3H, CH_3Pr).

5 ^{13}C RMN (D_2O), δ 174,5 (NHCO), 173,5 (CO_{Ac}), 171,5 (C-6A), 103,2 (C-1B, $^1J_{\text{CH}} = 163,2$ Hz), 102,3 (C-1A, $^1J_{\text{CH}} = 161,8$ Hz), 101,0 (C-1C, $^1J_{\text{CH}} = 174,7$ Hz), 99,8 (C-1D, $^1J_{\text{CH}} = 173,6$ Hz), 78,8 (C-2D), 76,7 (C-4A), 76,4 (C-2C), 74,8 (C-5B), 72,8 (C-3A), 72,7 (C-5A), 72,6 (C-3C), 72,2 (OCH_2Pr), 71,8 (C-4D), 70,2 (C-3B), 70,1 (C-2A), 70,0 (C-4C), 69,6 (C-3D), 69,2 (C-5D), 69,1 (C-5C), 67,6 (C-4B), 60,8 (C-6B), 52,4 (C-2B), 22,3 (CH_3NHAc), 22,1 (CH_2Pr), 20,5 (CH_3Ac), 16,6, 16,5 (2C, C-6D, C-6c), 9,6 (CH_3Pr RMNS (ESI⁺): m/z 796,2866 (calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{NO}_{21}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: m/z 796,2852). HPLC (215 nm): $R_t = 9,0$ minutos

Caracterización de tetrasacáridos de propilo adicionales que imitan unidades de repetición desplazadas del marco de O-Ags de SF6, SF6a y/o *E. coli* 0147, obtenidos según una estrategia de síntesis lineal.

10 Ácido propil β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosido (XIX).

15 ^1H RMN (D_2O), δ 5,01 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,4$ Hz, H-1C), 4,76 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,2$ Hz, H-1D), 4,55 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,4$ Hz, H-1B), 4,36 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,8$ Hz, H-1A), 4,23 (d, 1H, $J_{4,5} = 1,2$ Hz, H-5A), 4,12 (dd, 1H, $J_{3,4} = 3,4$ Hz, H-4A), 4,09 (d, 1H, $J_{3,4} = 3,1$ Hz, H-4B), 4,02 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2,8$ Hz, H-2C), 3,89 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10,9$ Hz, H-2B), 3,79 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,4$ Hz, H-2D), 3,77-3,69 (m, 3H, H-3B, H-3C, H-3D), 3,66 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 7,8$ Hz, $J_{6a,6b} = 11,9$ Hz, H-6aB), 3,64-3,53 (m, 5H, H-6bB, H-5C, H-3A, H-5B, H-5D), 3,51 (dt_{po}, 1H, $J = 7,0$ Hz, $J = 9,8$ Hz, OCH_2Pr), 3,41 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 9,9$ Hz, H-2A), 3,36 (dt_{po}, 1H, $J = 6,3$ Hz, OCH_2Pr), 3,31 (pt_{po}, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,6$ Hz, H-4D), 3,22 (pt, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,7$ Hz, H-4C), 1,89 (s, 3H, CH_3NHAc), 1,47 (psex, 2H, CH_2Pr), 1,15 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D), 1,12 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6C), 0,78 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, CH_3Pr).

20 ^{13}C RMN (D_2O), δ 174,9 (NHCO), 172,0 (C-6A), 104,6 (C-1A, $^1J_{\text{CH}} = 162,3$ Hz), 102,7 (C-1B, $^1J_{\text{CH}} = 163,4$ Hz), 101,1 (C-1C, $^1J_{\text{CH}} = 173,5$ Hz), 98,1 (C-1D, $^1J_{\text{CH}} = 171,8$ Hz), 79,9 (C-3B), 78,9 (C-2D), 78,4 (C-2C), 74,6 (C-5B), 73,7 (C-5A), 72,1 (C-4C), 72,0 (C-4D), 71,9 (C-3A), 69,9 (C-3D), 69,8 (C-2A), 69,7 (OCH_2Pr), 69,6 (C-4A), 69,4 (C-3C), 69,1 (C-5C), 68,6 (C-5D), 67,6 (C-4B), 60,9 (C-6B), 51,5 (C-2B), 22,3 (CH_3NHAc), 21,8 (CH_2Pr), 16,5 (2C, C-6D, C-6C), 9,7 (CH_3Pr).

HRMS (ESI⁺): m/z 754,2789 (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{NO}_{20}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: m/z 754,2745).

HPLC (215 nm): $R_t = 12,5$ min.

25 Ácido propil β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosido (XII).

30 ^1H RMN (D_2O), δ 5,03 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,7$ Hz, H-1C), 4,93 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,0$ Hz, $J_{3,4} = 10,0$ Hz, H-3C), 4,80 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,1$ Hz, H-1D), 4,40 (d_{po}, 1H, $J_{1,2} = 7,7$ Hz, H-1A), 4,39 (d_{po}, 1H, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1B), 4,23 (d, 1H, $J_{4,5} = 1,2$ Hz, H-5A), 4,15 (pt, 1H, H-2C), 4,13 (dd, 1H, $J_{3,4} = 3,4$ Hz, H-4A), 4,11 (d, 1H, $J_{3,4} = 2,9$ Hz, H-4B), 3,87 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 10,9$ Hz, H-2B), 3,83 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,3$ Hz, H-2D), 3,79 (dd, 1H, H-3B), 3,75-3,68 (m, 2H, H-3D, H-5C), 3,68-3,56 (m, 4H, H-6aB, H-6bB, H-3A, H-5D), 3,56-3,47 (m, 2H, H-5B, OCH_2Pr), 3,46-3,38 (m, 3H, H-2A, H-4D, H-4C), 3,37 (dt_{po}, 1H, $J = 6,4$ Hz, $J = 9,9$ Hz, OCH_2Pr), 2,07 (s, 3H, CH_3Ac), 1,95 (s, 3H, CH_3NHAc), 1,48 (psex, 2H, CH_2Pr), 1,17 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D*), 1,16 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6C*), 0,79 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, CH_3Pr).

35 ^{13}C RMN (D_2O), δ 174,7 (NHCO), 173,6 (CO_{Ac}), 172,2 (C-6A), 104,6 (C-1A, $^1J_{\text{CH}} = 162,1$ Hz), 102,7 (C-1B, $^1J_{\text{CH}} = 163,9$ Hz), 101,1 (C-1C, $^1J_{\text{CH}} = 176,5$ Hz), 98,0 (C-1D, $^1J_{\text{CH}} = 171,9$ Hz), 79,4 (C-2D), 79,1 (C-3B), 76,3 (C-2C), 74,5 (C-5B), 73,9 (C-5A), 72,6 (C-3C), 72,0, 71,9 (2C, C-3A, C-4D), 69,9-69,8 (3C, C-4C, C-2A, C-3D), 69,7 (OCH_2Pr), 69,5 (C-4A), 69,2 (C-5C), 68,6 (C-5D), 67,4 (C-4B), 60,8 (C-6B), 51,4 (C-2B), 22,3 (CH_3NHAc), 21,8 (CH_2Pr), 20,5 (CH_3Ac), 16,5 (2C, C-6D, C-6C), 9,7 (CH_3Pr).

HRMS (ESI⁺): m/z 796,2831 (calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{NO}_{21}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: m/z 796,2852).

40 HPLC (215 nm): $R_t = 13,5$ min

Ácido propil β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-4-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosido (XII').

45 ^1H RMN (D_2O), δ 5,06 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,6$ Hz, H-1C), 4,80 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,1$ Hz, H-1D), 4,73 (pt, 1H, $J_{4,5} = 9,8$ Hz, H-4C), 4,63 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,4$ Hz, H-1B), 4,39 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,8$ Hz, H-1A), 4,20 (d, 1H, $J_{4,5} = 1,1$ Hz, H-5A), 4,16-4,13 (m, 3H, H-2C, H-4A, H-4B), 4,00 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,0$ Hz, $J_{3,4} = 9,9$ Hz, H-3C), 3,94 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10,9$ Hz, H-2B), 3,86 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,3$ Hz, H-2D), 3,84-3,74 (m, 3H, H-3B, H-3D, H-5C), 3,72 (dd_{po}, 1H, $J_{5,6a} = 7,7$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,0$ Hz, H-6aB), 3,67 (dd_{po}, 1H, $J_{5,6b} = 4,7$ Hz, H-6bB), 3,64-3,56 (m, 3H, H-3A, H-5D, H-5B), 3,55 (pt_{po}, 1H, $J = 6,9$ Hz, $J = 9,8$ Hz, OCH_2Pr), 3,46 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10,0$ Hz, H-2A), 3,40 (dt, 1H, $J = 6,3$ Hz, OCH_2Pr), 3,36 (pt, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,7$ Hz, H-4D), 2,06 (s, 3H, CH_3Ac), 1,93 (s, 3H, CH_3NHAc), 1,51 (psex, 2H, CH_2Pr), 1,20 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D), 1,06 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6C), 0,82 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, CH_3Pr).

50 ^{13}C RMN (D_2O), δ 175,0 (NHCO), 173,7 (CO_{Ac}), 172,6 (C-6A), 104,3 (C-1A, $^1J_{\text{CH}} = 162,6$ Hz), 102,4 (C-1B, $^1J_{\text{CH}} = 164,1$ Hz), 101,1 (C-1C, $^1J_{\text{CH}} = 175,0$ Hz), 98,1 (C-1D, $^1J_{\text{CH}} = 171,4$ Hz), 79,9 (C-3B), 79,1 (C-2D), 77,6 (C-2C), 74,8 (C-5B), 74,1 (2C, C-5A, C-4C), 72,2 (C-4D), 72,1 (C-3A), 70,0 (2C, C-2A, C-3D), 69,8 (OCH_2Pr), 69,7 (C-4A), 68,6 (C-5D), 68,1 (C-

ES 2 922 818 T3

3c), 67,7 (C-4B), 67,1 (C-5c), 61,0 (C-6B), 51,6 (C-2B), 22,3 (CH₃NHAc), 21,9 (CH₂Pr), 20,5 (CH₃Ac), 16,6, 16,5 (2C, C-6D, C-6c), 9,8 (CH₃Pr).

HRMS (ESI⁺): *m/z* 796,2927 (calculado para C₃₁H₅₁NO₂₁Na [M+Na]⁺: *m/z* 786,2852).

HPLC (215 nm): R_t = 17,3 min.

- 5 Propil α-L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosido (XVI).

10 ¹H RMN (D₂O), δ 5,09 (d, 1H, J_{1,2} = 1,6 Hz, H-1D), 4,90 (d, 1H, J_{1,2} = 1,5 Hz, H-1C), 4,63 (d, 1H, J_{1,2} = 8,4 Hz, H-1B), 4,44 (d, 1H, J_{1,2} = 7,7 Hz, H-1A), 4,33 (d, 1H, J_{4,5} = 1,1 Hz, H-5A), 4,29 (dd, 1H, J_{3,4} = 3,1 Hz, H-4A), 4,15 (d, 1H, J_{3,4} = 3,1 Hz, H-4B), 4,01 (dd, 1H, J_{2,3} = 3,4 Hz, H-2D), 3,96 (dd_{po}, 1H, J_{2,3} = 10,8 Hz, H-2B), 3,94 (dd_o, 1H, H-2C), 3,83-3,73 (m, 3H, H-3A, H-3B, H-3C), 3,73-3,67 (m, 3H, H-6aB, H-6bB, H-3D), 3,64-3,49 (m, 5H, H-5C, H-5B, OCH₂Pr, H-5D, H-2A), 3,42 (dt, 1H, J = 6,2 Hz, J = 9,8 Hz, OCH₂Pr), 3,33 (pt, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9,8 Hz, H-4D), 3,27 (pt, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9,6 Hz, H-4C), 1,96 (s, 3H, CH₃NHAc), 1,53 (sex, 2H, CH₂Pr), 1,20 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6C), 1,17 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D), 0,83 (t, 3H, J = 7,5 Hz, CH₃Pr).

15 ¹³C RMN (D₂O), δ 175,0 (NHCO), 171,6 (C-6A), 104,5 (C-1A, ¹J_{CH} = 163,1 Hz), 102,7 (C-1B, ¹J_{CH} = 163,5 Hz), 101,5 (C-1D, ¹J_{CH} = 174,2 Hz), 98,5 (C-1C, ¹J_{CH} = 174,6 Hz), 80,3 (C-3B), 78,5 (C-2C), 76,3 (C-4A), 74,7 (C-5B), 72,9 (C-5A), 72,7 (C-3A), 70,0 (C-4C), 71,7 (C-4D), 72,3 (C-2D), 70,1 (C-3C), 69,6 (C-3D), 69,8 (C-2A), 69,7 (OCH₂Pr), 69,2 (C-5D), 68,6 (C-5C), 67,7 (C-4B), 60,9 (C-6B), 51,6 (C-2B), 22,4 (CH₃NHAc), 21,9 (CH₂Pr), 16,6, 16,5 (2C, C-6D, C-6c), 9,8 (CH₃Pr).

HRMS (ESI⁺): *m/z* 754,2788 (calculado para C₂₉H₄₉NO₂₀Na [M+Na]⁺: *m/z* 754,2745).

HPLC (215 nm): R_t = 10,5 min.

- 20 propil α-L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-3-O-acetil-α-L-ramnopiranosido (XV).

25 ¹H RMN (D₂O), δ 5,03 (d, 1H, J_{1,2} = 1,5 Hz, H-1D), 4,93 (dd, 1H, J_{2,3} = 3,0 Hz, J_{3,4} = 10,0 Hz, H-3C), 4,84 (d, 1H, J_{1,2} = 1,7 Hz, H-1C), 4,42 (d, 1H, J_{1,2} = 7,8 Hz, H-1A), 4,38 (d, 1H, J_{1,2} = 8,2 Hz, H-1B), 4,28 (d, 1H, J_{4,5} = 1,1 Hz, H-5A), 4,23 (dd, 1H, J_{3,4} = 2,8 Hz, H-4A), 4,10 (d, 1H, J_{3,4} = 2,9 Hz, H-4B), 4,00 (dd, 1H, H-2C), 3,96 (dd, 1H, J_{2,3} = 3,3 Hz, H-2D), 3,88 (dd, 1H, J_{2,3} = 10,8 Hz, H-2B), 3,78 (dd, 1H, H-3B), 3,73 (dd, 1H, J_{2,3} = 10,0 Hz, H-3A), 3,69-3,59 (m, 4H, H-6aB, H-6bB, H-3D, OCH₂Pr), 3,58-3,43 (m, 4H, H-5C, H-5B, H-5D, H-2A), 3,43-3,35 (m, 2H, OCH₂Pr, H-4C), 3,27 (pt, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9,7 Hz, H-4D), 2,06 (s, 3H, CH₃Ac), 1,94 (s, 3H, CH₃NHAc), 1,48 (sex, 2H, CH₂Pr), 1,17 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6C), 1,11 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D), 0,78 (t, 3H, J = 7,5 Hz, CH₃Pr).

30 ¹³C RMN (D₂O), δ 174,5 (NHCO), 173,4 (COAc), 171,6 (C-6A), 104,3 (C-1A, ¹J_{CH} = 163,6 Hz), 102,6 (C-1B, ¹J_{CH} = 165,7 Hz), 101,4 (C-1D, ¹J_{CH} = 174,6 Hz), 98,5 (C-1C, ¹J_{CH} = 175,3 Hz), 79,8 (C-3B), 76,4 (C-2C), 76,3 (C-4A), 74,4 (C-5B), 72,8 (2C, C-3A, C-3C), 72,6 (C-5A), 71,7 (C-4D), 70,2 (2C, C-4C, C-2D), 69,8 (C-2A), 69,7 (C-3D), 69,6 (OCH₂Pr), 69,1 (C-5D), 68,6 (C-5C), 67,5 (C-4B), 60,8 (C-6B), 51,4 (C-2B), 22,5 (CH₃NHAc), 21,9 (CH₂Pr), 20,5 (CH₃Ac), 16,5 (2C, C-6D, C-6c), 9,7 (CH₃Pr).

HRMS (ESI⁺): *m/z* 796,5854 (calculado para C₃₁H₅₁NO₂₁Na [M+Na]⁺: *m/z* 796,2852).

35 HPLC (215 nm): R_t = 12,7 min.

- Propil α-L-ramnopiranosil-(1→4)-Ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-4-O-acetil-α-L-ramnopiranosido (XV').

40 ¹H RMN (D₂O), δ 5,09 (d, 1H, J_{1,2} = 1,6 Hz, H-1D), 4,90 (d, 1H, J_{1,2} = 1,6 Hz, H-1C), 4,73 (pt, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9,8 Hz, H-4C), 4,66 (d, 1H, J_{1,2} = 8,4 Hz, H-1B), 4,44 (d, 1H, J_{1,2} = 7,8 Hz, H-1A), 4,30 (d, 1H, J_{4,5} = 1,2 Hz, H-5A), 4,28 (dd, 1H, J_{3,4} = 2,9 Hz, H-4A), 4,16 (d, 1H, J_{3,4} = 3,1 Hz, H-4B), 4,04-4,00 (m, 2H, H-2C, H-2D), 4,00-3,94 (m, 2H, H-3C, H-2B), 3,83-3,67 (m, 6H, H-3B, H-3A, H-6aB, H-6bB, H-3D, H-5C), 3,62-3,50 (m, 4H, OCH₂Pr, H-5B, H-5D, H-2A), 3,43 (dt, 1H, J = 6,4 Hz, J = 9,7 Hz, OCH₂Pr), 3,32 (pt, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9,7 Hz, H-4D), 2,07 (s, 3H, CH₃Ac), 1,95 (s, 3H, CH₃NHAc), 1,53 (sex, 2H, CH₂Pr), 1,16 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D), 1,09 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6C), 0,83 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃Pr).

45 ¹³C RMN (D₂O), δ 175,1 (NHCO), 173,7 (COAc), 171,8 (C-6A), 104,5 (C-1A, ¹J_{CH} = 162,7 Hz), 102,3 (C-1B, ¹J_{CH} = 164,9 Hz), 101,4 (C-1D, ¹J_{CH} = 173,9 Hz), 98,7 (C-1C, ¹J_{CH} = 174,4 Hz), 80,3 (C-3B), 77,6 (C-2C), 76,2 (C-4A), 74,8 (C-5B), 74,3 (C-4C), 72,6 (C-5A), 72,8 (C-3A), 71,8 (C-4D), 70,2 (C-2D), 69,9 (C-3D), 69,8 (2C, OCH₂Pr, C-2A), 69,2 (C-5D), 68,4 (C-3C), 67,8 (C-4B), 66,5 (C-5C), 61,0 (C-6B), 51,6 (C-2B), 22,3 (CH₃NHAc), 22,0 (CH₂Pr), 20,5 (CH₃Ac), 16,6, 16,5 (2C, C-6D, C-6c), 9,8 (CH₃Pr).

HRMS (ESI⁺): *m/z* 796,2884 (calculado para C₃₁H₅₁NO₂₁Na [M+Na]⁺: *m/z* 798,2852).

50 HPLC (215 nm): R_t = 16,4 min.

Propil α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosido (XXXV).

5 $^1\text{H RMN}$ (D_2O), δ 5,20 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,3$ Hz, H-1D), 4,80 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,4$ Hz, H-1C), 4,36 (d, 2H, $J_{1,2} = 8,0$ Hz, H-1A, H-1B), 4,36 (d, 1H, $J_{4,5} = 1,1$ Hz, H-5A), 4,20 (dd, 1H, $J_{3,4} = 2,8$ Hz, H-4A), 4,08 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,0$ Hz, H-4B), 3,93 (dd, 1H, H-2D), 3,90 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,4$ Hz, H-2C), 3,86 (dd, 1H, $J_{1,2} = 8,6$ Hz, $J_{2,3} = 10,8$ Hz, H-2B), 3,72 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 3,3$ Hz, H-3D), 3,71-3,63 (m, 5H, OCH_{2Pr}, H-3A, H-3B, H-6aB, H-6bB), 3,61 (dd_{po}, 1H, H-3C), 3,57-3,50 (m, 2H, H-5C, H-5B), 3,46 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 9,8$ Hz, H-2A), 3,45-3,38 (m, 2H, OCH_{2Pr}, H-5D), 3,29 (pt, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,7$ Hz, H-4D), 3,28 (pt, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,7$ Hz, H-4C), 1,86 (s, 3H, CH_{3NHAc}), 1,40 (sex, 2H, CH_{2Pr}), 1,10 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6C), 1,09 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D), 0,72 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, CH_{3Pr}).

10 $^{13}\text{C RMN}$ (D_2O), δ 174,7 (NHCO), 171,5 (C-6A), 104,5 (C-1A, $^1J_{\text{CH}} = 164,1$ Hz), 102,0 (C-1C, $^1J_{\text{CH}} = 172,0$ Hz), 101,1 (C-1B, $^1J_{\text{CH}} = 161,8$ Hz), 99,9 (C-1D, $^1J_{\text{CH}} = 175,7$ Hz), 80,7 (C-3B), 78,2 (C-2D), 76,3 (C-4A), 74,6 (C-5B), 72,7 (C-3A), 72,5 (C-5A), 72,1 (OCH_{2Pr}), 71,9, 71,7 (2C, C-4C, C-4D), 69,9 (2C, C-2C, C-3C), 69,7, 69,6 (2C, C-2A, C-3D), 69,2 (C-5D), 68,9 (C-5C), 67,7 (C-4B), 60,8 (C-6B), 51,2 (C-2B), 22,1 (CH_{3NHAc}), 22,0 (CH_{2Pr}), 16,6, 16,5 (2C, C-6D, C-6C), 9,5 (CH_{3Pr}).

HRMS (ESI⁺): m/z 754,2769 (calculado para C₂₉H₄₉NO₂₀Na [M+Na]⁺: m/z 754,2745).

15 HPLC (215 nm): R_t = 8,9 min.

Propil 3-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosido (XXXVI).

20 $^1\text{H RMN}$ (D_2O), δ 5,32 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,4$ Hz, H-1D), 4,90 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 3,3$ Hz, $J_{3,4} = 9,9$ Hz, H-3C), 4,90 (do, 1H, H-1C), 4,44 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,6$ Hz, H-1B), 4,43 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,8$ Hz, H-1A), 4,34 (d, 1H, $J_{4,5} = 1,1$ Hz, H-5A), 4,28 (dd, 1H, $J_{3,4} = 2,8$ Hz, H-4A), 4,16 (d, 1H, $J_{3,4} = 3,0$ Hz, H-4B), 4,12 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1,9$ Hz, H-2C), 4,02 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,2$ Hz, H-2D), 3,94 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10,8$ Hz, H-2B), 3,80 (dd, 1H, H-3D), 3,79-3,68 (m, 5H, H-3A, H-3B, OCH_{2Pr}, H-6aB, H-6bB), 3,61 (m, 1H, H-5B), 3,56 (pt_o, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,9$ Hz, H-4C), 3,58-3,51 (m, 3H, H-5C, H-5D, H-2A), 3,49 (dt, 1H, $J = 10,2$ Hz, OCH_{2Pr}), 3,41 (pt, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,7$ Hz, H-4D), 2,09 (s, 3H, CH_{3Ac}), 1,94 (s, 3H, CH_{3NHAc}), 1,48 (sex, 2H, CH_{2Pr}), 1,22 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6C), 1,19 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D), 0,79 (t, 3H, CH_{3Pr}).

25 $^{13}\text{C RMN}$ (D_2O), δ 174,8 (NHCO), 173,6 (CO_{Ac}), 171,6 (C-6A), 104,6 (C-1A, $^1J_{\text{CH}} = 163,6$ Hz), 101,7 (C-1C, $^1J_{\text{CH}} = 172,6$ Hz), 101,2 (C-1B, $^1J_{\text{CH}} = 163,6$ Hz), 99,9 (C-1D, $^1J_{\text{CH}} = 173,5$ Hz), 80,7 (C-3B), 78,7 (C-2D), 76,4 (C-4A), 74,7 (C-5B), 73,5 (C-3C), 72,9 (C-5A), 72,7 (C-3A), 72,3 (OCH_{2Pr}), 71,8 (C-4D), 69,8 (C-4C), 69,7 (2C, C-3D, C-2A*), 69,3 (C-5C*), 69,0 (C-5D), 68,0 (C-2C), 67,8 (C-4B), 60,9 (C-6B), 51,3 (C-2B), 22,2 (CH_{3NHAc}), 22,1 (CH_{2Pr}), 20,4 (CH_{3Ac}), 16,7, 16,6 (2C, C-6D, C-6C), 9,6 (CH_{3Pr}).

30 HRMS (ESI⁺): m/z 796,2878 (calculado para C₃₁H₅₁NO₂₁Na [M+Na]⁺: m/z 796,2852).

HPLC (215 nm): R_t = 9,5 min.

Caracterización de propilpentasacáridos adicionales que simulan unidades de repetición desplazadas en el marco de O-Ags de SF6, SF6a y/o *E. coli* 0147, obtenidos según una estrategia de síntesis lineal.

35 Propil 3-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O-acetil- α -L-ramnopiranosido (XIX)

40 $^1\text{H RMN}$ (D_2O), δ 5,31 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,2$ Hz, H-1D), 4,96 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,0$ Hz, $J_{3,4} = 9,0$ Hz, H-3C), 4,88 (dd_o, 1H, $J_{2,3} = 3,0$ Hz, $J_{3,4} = 9,8$ Hz, H-3C), 4,88-4,87 (m, 2H, H-1C, H-1C), 4,76 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,9$ Hz, H-1A), 4,42 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1B), 4,33 (d_{po}, 1H, $J_{4,5} = 1,2$ Hz, H-5A), 4,26 (dd_o, 1H, H-4A), 4,14 (bd, 1H, $J_{3,4} = 2,6$ Hz, H-4B), 4,11 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1,9$ Hz, H-2C), 4,03 (pt, 1H, H-2C), 4,01 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,3$ Hz, H-2D), 3,92 (bdd, 1H, $J_{2,3} = 10,6$ Hz, H-2B), 3,82 (dd, 1H, H-3B), 3,80-3,64 (m, 6H, H-3D, H-3A, H-6aB, H-6bB, H-5C, H-5C), 3,62-3,47 (m, 5H, H-5B, H-5D, OCH_{2Pr}, H-2A, H-4C), 3,47-3,33 (m, 3H, OCH_{2Pr}, H-4D, H-4C), 2,10 (s, 3H, CH_{3Ac-3C}), 2,07 (s, 3H, CH_{3Ac-3C}), 1,98 (s, 3H, CH_{3NHAc}), 1,52 (psex, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_{2Pr}), 1,23-1,15 (m, 9H, H-6D, H-6C, H-6C), 0,83 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, CH_{3Pr}).

45 $^{13}\text{C RMN}$ (D_2O), δ 174,5 (NHCO), 173,6 (CO_{Ac-3C}), 173,4 (CO_{Ac-3C}), 171,6 (C-6A), 104,3 (C-1A), 102,6 (C-1B), 101,7 (C-1C), 99,9 (C-1D), 98,5 (C-1C), 79,8 (C-3B), 78,7 (C-2D), 76,4 (C-4A), 76,2 (C-2C), 74,5 (C-5B), 73,5 (C-3C), 72,9 (2C, C-3C, C-5A), 72,6 (C-3A), 71,8 (C-4D), 70,9 (C-4C), 69,8 (C-4C), 69,7-68,7 (6C, C-3D, OCH_{2Pr}, C-2A, C-5C, C-5D, C-5C), 68,0 (C-2C), 67,5 (C-4B), 60,8 (C-6B), 51,5 (C-2B), 22,3 (CH_{3NHAc}), 21,9 (CH_{2Pr}), 20,5, 20,4 (2C, CH_{3Ac}), 16,6-16,4 (3C, C-6D, C-6C, C-6C), 9,8 (CH_{3Pr}).

Propil 2-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ácido β -D-galactopiranosilurónico-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O-acetil- α -L-ramnopiranosido (XIX)

50 $^1\text{H RMN}$ (D_2O), δ 5,28 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,2$ Hz, H-1D), 5,12 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1,7$ Hz, $J_{2,3} = 3,4$ Hz, H-2C), 4,96 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,0$ Hz, $J_{3,4} = 9,0$ Hz, H-3C), 4,92 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,5$ Hz, H-1C), 4,88 (do, 1H, H-1C), 4,75 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,9$ Hz, H-1A), 4,42 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1B), 4,33 (d_{po}, 1H, $J_{4,5} = 1,2$ Hz, H-5A), 4,26 (dd_o, 1H, H-4A), 4,14 (bd, 1H, $J_{3,4} = 2,6$ Hz, H-4B), 4,03 (pt, 1H, H-2C), 4,01 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,3$ Hz, H-2D), 3,92 (bdd, 1H, $J_{2,3} = 10,6$ Hz, H-2B), 3,87 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9,8$ Hz, H-3C), 3,82 (dd, 1H, H-3B), 3,80-3,64 (m, 6H, H-3D, H-3A, H-6aB, H-6bB, H-5C, H-5C), 3,62-3,47 (m, 4H, H-5B, H-5D,

OCH_{2Pr}, H-2A), 3,47-3,33 (m, 4H, OCH_{2Pr}, H-4D, H-4C, H-4C), 2,10 (s, 3H, CH_{3Ac-3C}), 2,06 (s, 3H, CH_{3Ac-2C}), 1,98 (s, 3H, CH_{3NHAc}), 1,52 (psex, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH_{2Pr}), 1,23-1,15 (m, 9H, H-6D, H-6C, H-6C), 0,83 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH_{3Pr}).

¹³C RMN (D₂O), δ 174,5 (NHCO), 173,4 (CO_{Ac-3C}), 173,1 (CO_{Ac-2C}), 171,6 (C-6A), 104,3 (C-1A), 102,6 (C-1B), 99,9 (C-1D), 99,1 (C-1C), 98,5 (C-1C), 79,8 (C-3B), 78,8 (C-2D), 76,4 (C-4A), 76,2 (C-2C), 74,5 (C-5B), 72,9 (2C, C-3C, C-5A), 72,6 (C-3A), 72,3 (C-2C), 72,2 (C-4C), 71,8 (C-4D), 70,9 (C-4C), 69,7-68,7 (6C, C-3D, OCH_{2Pr}, C-2A, C-5C, C-5D, C-5C), 68,5 (C-3C), 67,5 (C-4B), 60,8 (C-6B), 51,5 (C-2B), 22,3 (CH_{3NHAc}), 21,9 (CH_{2Pr}), 20,5, 20,3 (2C, CH_{3Ac}), 16,6-16,4 (3C, C-6D, C-6C, C-6C), 9,8 (CH_{3Pr}).

HRMS (ESI⁺): *m/z* 984,3530 (calculado para C₃₆H₆₃NO₂₆Na [M+Na]⁺: *m/z* 984,3530).

HPLC (215 nm): R_t = 13,2 min.

10 Propil 4-*O*-acetil-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-3-*O*-acetil-α-L-ramnopiranosido (XIX)).

¹H RMN (D₂O), δ 5,24 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1,3 Hz, H-1D), 4,93 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 3,0 Hz, *J*_{3,4} = 10,0 Hz, H-3C), 4,86 (do, 1H, *J*_{1,2} = 1,7 Hz, H-1C), 4,85 (do, 1H, *J*_{1,2} = 1,7 Hz, H-1C), 4,75 (t, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9,9 Hz, H-4C), 4,41 (d, 1H, *J*_{1,2} = 7,8 Hz, H-1A), 4,38 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8,3 Hz, H-1B), 4,21 (bs, 2H, H-4A, H-5A), 4,11 (d, 1H, *J*_{3,4} = 3,0 Hz, H-4B), 4,01 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 2,7 Hz, H-2C), 3,97 (dd_{po}, 1H, *J*_{2,3} = 3,5 Hz, H-2C), 3,96 (dd_{po}, 1H, H-2D), 3,88 (dd_{po}, 1H, *J*_{2,3} = 11,0 Hz, H-2B), 3,85 (dd_{po}, 1H, *J*_{2,3} = 3,4 Hz, *J*_{3,4} = 9,9 Hz, H-3C), 3,79-3,69 (m, 4H, H-3A, H-3B, H-3D, H-5C), 3,68-3,62 (m, 3H, H-5C, H-6aB, H-6bB), 3,56-3,47 (m, 4H, H-5D, OCH_{2Pr}, H-2A, H-5B), 3,40 (t, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9,7 Hz, H-4C), 3,39 (dt_{po}, 1H, *J* = 6,3 Hz, *J* = 9,8 Hz, OCH_{2Pr}), 3,41 (pt, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9,8 Hz, H-4D), 2,06 (s, 3H, CH_{3Ac}), 2,03 (s, 3H, CH_{3Ac}), 1,94 (s, 3H, CH_{3NHAc}), 1,49 (sex, 2H, *J* = 7,1 Hz, CH_{2Pr}), 1,17 (d, 3H, *J*_{5,6} = 6,3 Hz, H-6C), 1,19 (d, 3H, *J*_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D), 1,03 (d, 3H, *J*_{5,6} = 6,2 Hz, H-6C), 0,79 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH_{3Pr}).

¹³C RMN (D₂O), δ 174,5 (NHCO), 173,7, 173,4 (2C, CO_{Ac}), 171,6 (C-6A), 104,3 (C-1A), 102,5 (C-1B), 102,4 (C-1C), 99,7 (C-1D), 99,3 (C-1C), 79,8 (C-3B), 78,6 (C-2D), 76,2 (2C, C-2C, C-4A), 74,6 (C-5B), 73,8 (C-4C), 73,2 (C-5A), 73,7 (2C, C-3C, C-3A), 71,8 (C-4D), 69,9-69,2 (5C, C, C-2C, C-4C, C-2A, C-3D, OCH_{2Pr}), 68,4 (C-5D), 68,1 (C-5C), 67,5 (C-3C), 66,8 (2C, C-4B, C-5C), 60,7 (C-6B), 51,2 (C-2B), 22,3 (CH_{3NHAc}), 21,9 (CH_{2Pr}), 20,5, 20,4 (2C, CH_{3Ac}), 16,5, 16,4 (3C, C-6D, C-6C, C-6C), 9,7 (CH_{3Pr}).

Propil α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-ácido β-D-galactopiranosilurónico-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosido (XX).

¹H RMN (D₂O), δ 5,28 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1,4 Hz, H-1D), 4,90 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1,5 Hz, H-1C), 4,88 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1,6 Hz, H-1C), 4,63 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8,4 Hz, H-1B), 4,45 (d, 1H, *J*_{1,2} = 7,9 Hz, H-1A), 4,34 (d, 1H, *J*_{4,5} = 1,1 Hz, H-5A), 4,28 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 2,9 Hz, H-4A), 4,16 (d, 1H, *J*_{3,4} = 3,2 Hz, H-4B), 4,01 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 3,2 Hz, H-2D), 4,00-3,93 (m, 3H, H-2B, H-2C, H-2C), 3,83-3,67 (m, 7H, H-3A, H-3B, H-3C, H-3C, H-6aB, H-6bB, H-3D), 3,66-3,49 (m, 6H, H-5C, H-5C, H-5B, OCH_{2Pr}, H-5D, H-2A), 3,43 (dt, 1H, *J* = 6,3 Hz, *J* = 9,8 Hz, OCH_{2Pr}), 3,37 (pt, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9,8 Hz, H-4D), 3,36 (pt, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9,7 Hz, H-4C), 3,27 (pt, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9,6 Hz, H-4C), 1,96 (s, 3H, CH_{3NHAc}), 1,53 (psex, 2H, CH_{2Pr}), 1,21-1,16 (m, 9H, H-6C, H-6C, H-6D), 0,83 (t, 3H, *J* = 7,5 Hz, CH_{3Pr}).

¹³C RMN (D₂O), δ 175,0 (NHCO), 171,6 (C-6A), 104,5 (C-1A, ¹*J*_{CH} = 163,1 Hz), 102,7 (C-1B, ¹*J*_{CH} = 163,1 Hz), 102,1 (C-1C, ¹*J*_{CH} = 171,3 Hz), 100,0 (C-1D, ¹*J*_{CH} = 175,3 Hz), 98,5 (C-1C, ¹*J*_{CH} = 174,0 Hz), 80,4 (C-3B), 78,5 (C-2C), 78,3 (C-2D), 76,3 (C-4A), 74,7 (C-5B), 72,9 (C-5A), 72,6 (C-3A), 72,3 (C-4C), 72,1, 71,9 (2C, C-4D, C-4C), 70,1 (C-2C), 70,0 (2C, C-3C, C-3C), 69,8 (C-2A), 69,7 (C-3D), 69,6 (OCH_{2Pr}), 69,3 (C-5D), 69,0 (C-5C), 68,6 (C-5C), 67,7 (C-4B), 60,9 (C-6B), 51,6 (C-2B), 22,4 (CH_{3NHAc}), 21,9 (CH_{2Pr}), 16,7-16,5 (3C, C-6D, C-6C, C-6C), 9,8 (CH_{3Pr}).

40 HRMS (ESI⁺): *m/z* 900,3400 (calculado para C₃₅H₅₉NO₂₄Na [M+Na]⁺: *m/z* 900,3325).

HPLC (215 nm): R_t = 10,7 min.

B. Estrategia sintética convergente

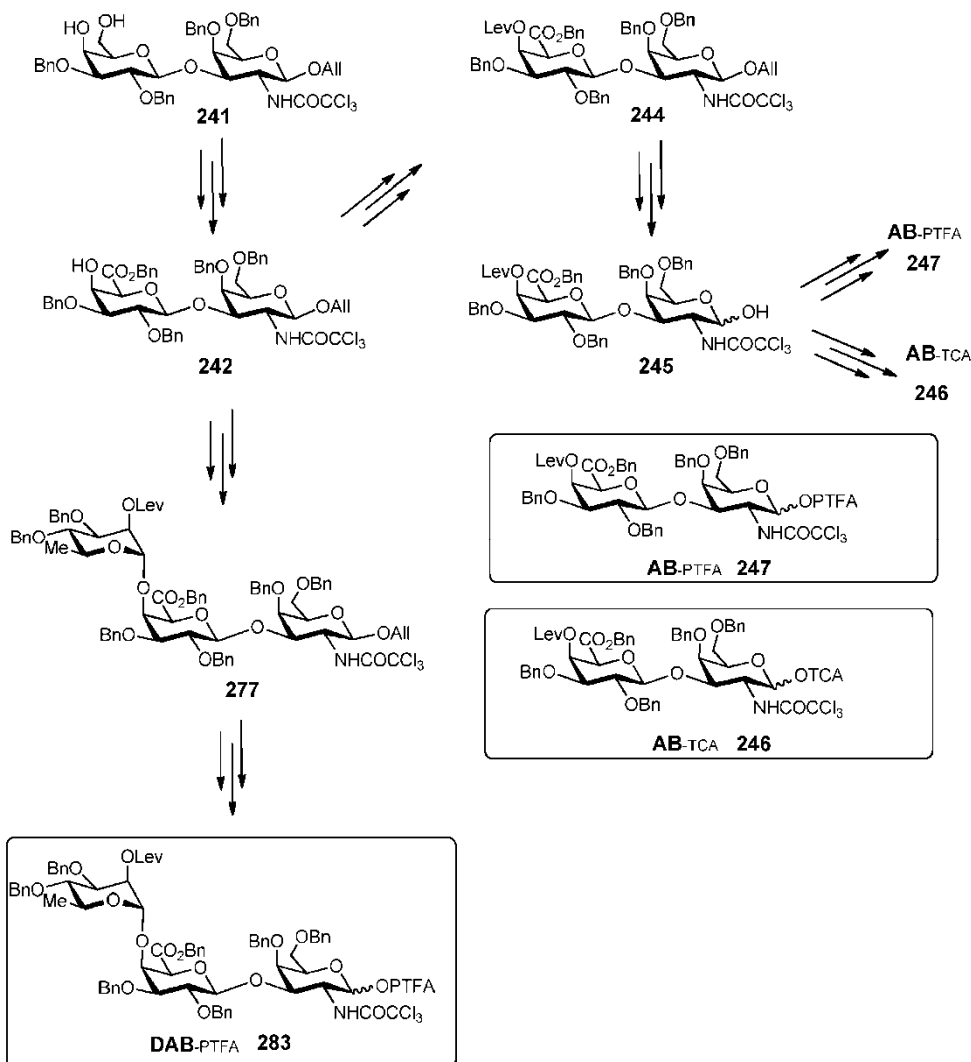
La síntesis convergente se refiere a un proceso mediante el cual la elongación de la cadena comprometida para obtener el objetivo de oligo-polisacárido involucra bloques de construcción predefinidos que comprenden, al menos en parte, más de un residuo. Los bloques de construcción de interés incluyen aceptores (que llevan el residuo de la cadena terminal "reductora"), donantes (que llevan el residuo de la cadena terminal no reductora) o donantes que actúan como aceptores potenciales (diseñados para permitir el desenmascaramiento selectivo del grupo hidroxilo involucrado en el siguiente paso de glucosilación), que a menudo se utilizan repetidamente en la síntesis de objetivos mayores de 1 unidad de repetición, preferentemente más de 2 unidades de repetición. Los bloques de construcción seleccionados se combinan en un orden predeterminado. Las estrategias convergentes se utilizan ventajosamente, por un lado, para alcanzar objetivos de oligo- polisacáridos que comprenden más de una unidad de repetición y, por otro lado, para evitar glucosilaciones difíciles en una etapa avanzada. La necesidad de rutas altamente convergentes hacia oligo- y polisacáridos sintéticos que imiten fragmentos grandes del O-Ag de SF6, SF6a y/o *E. coli* O147 (hasta 10 unidades de repetición), nos llevó a diseñar un conjunto de bloques de construcción (ver Tabla I), cuya combinación proporciona un acceso, en teoría, a los objetivos requeridos. Ventajosamente, los bloques de construcción

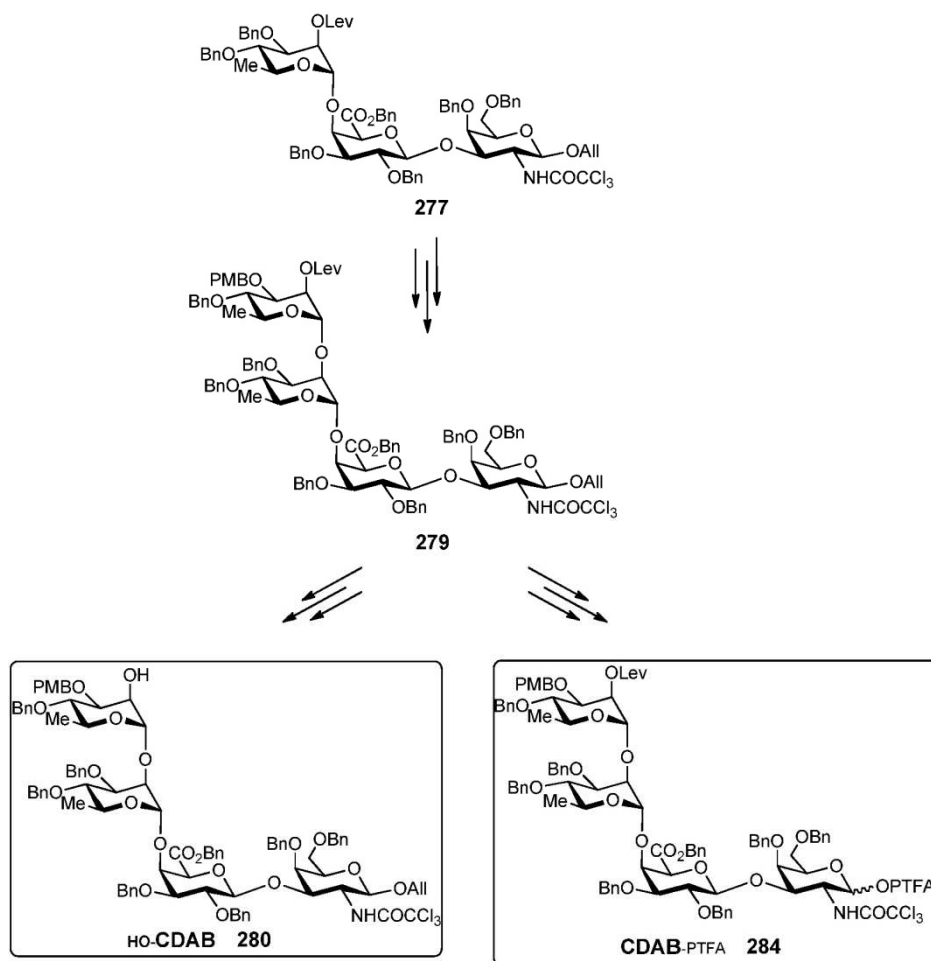
seleccionados tienen en cuenta la diversidad tanto de los residuos de la cadena final como de la longitud de la cadena dentro de los fragmentos O-Ag de interés. En la búsqueda de la eficiencia, se diseñaron según una desconexión en el enlace B-C.

Síntesis de bloques de construcción seleccionados que se muestran en la Tabla I a partir de intermedios clave

- 5 Un logro importante es que todos los bloques de construcción seleccionados derivan de precursores comunes diseñados a propósito. En particular, disacárido (HO)₂-AB (241) y donantes de ramnosilo protegidos en la posición 3 en forma de un *para*-metoxibenciléter (43, 119, 166) fueron identificados como intermedios importantes.

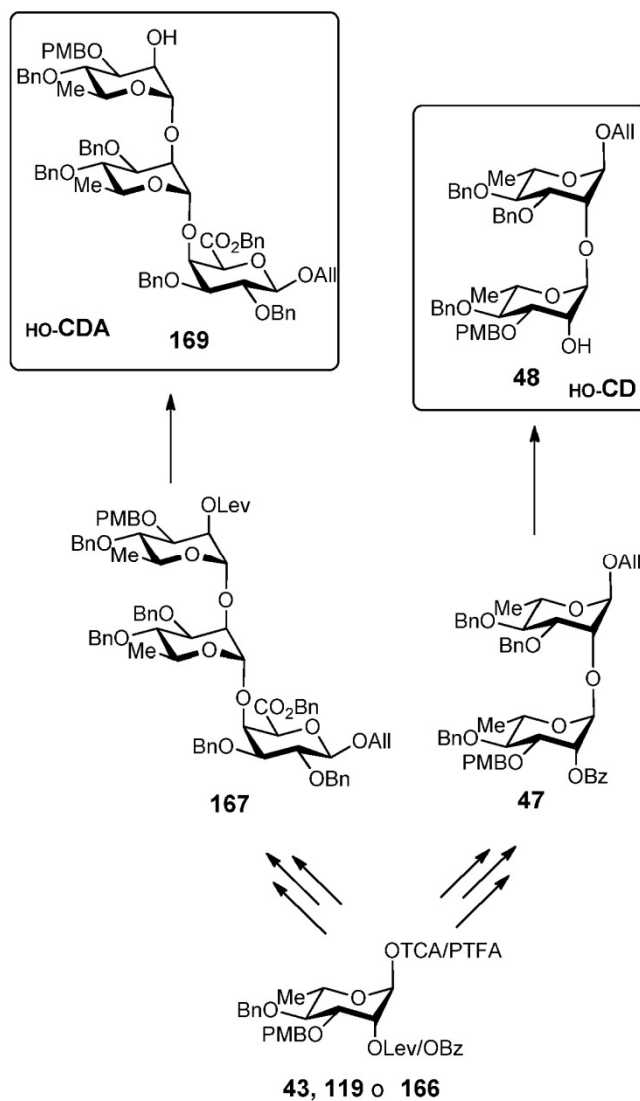
Disacárido AB como plantilla: como se ve en el esquema 6, tras un ajuste apropiado que abarque la oxidación/bencilación controlada de su grupo hidroxilo primario libre, el diol clave 241 se convierte en el aceptor HO-AB 242. Por un lado, enmascarar los 4_A-OH del último seguido de la desalilación/activación anomérica apropiada del intermedio completamente protegido 244, proporcionados los donantes útiles AB-TCA y AB-PTFA (246, 247), vía hemiacetal 245. Por otro lado, el aceptor 242 se glucosiló eficientemente en la posición 4_A, para dar el trisacárido 277, que se convirtió en el correspondiente donante DAB-PTFA (283). La delevulinolación selectiva del 277 protegido totalmente, y posterior glucosilación en el 2_D-OH dio el tetrasacárido 279, que se convirtió ventajosamente en el aceptor HO-CDAB (280) y al donante CDAB-PTFA (284), después de la manipulación apropiada del grupo protector.

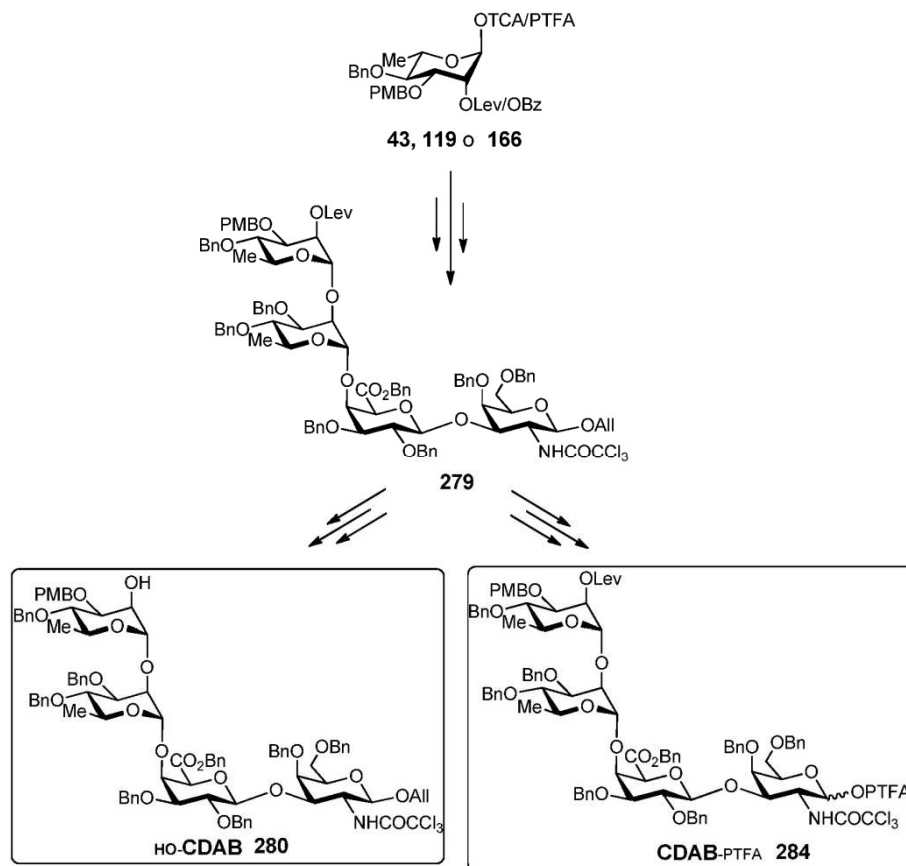




Esquema 6

Donantes de ramnosilo C como intermedios principales: como se ve en el esquema 7, cuando se hace reaccionar con el aceptor conocido alil 3,4-di-O-bencil- α -L-ramnósido (D),^[29] el donante de tricloroacetimidato 43 dio el ramnobióside completamente protegido 47, que se convirtió fácilmente en el aceptor correspondiente 48, tras el desenmascaramiento selectivo de OH-2c en condiciones de transesterificación. Alternativamente, cuando un aceptor apropiado HO-DA se utiliza en lugar del ramnósido D mencionado anteriormente, para acoplamiento a los donantes C-TCA (119) o C-PTFA (166), el trisacárido CDA totalmente protegido se aísla con rendimientos superiores al 90% y, a continuación, se puede convertir fácilmente al aceptor HO-CDA (169), tras hidrazinólisis controlada del éster de levulinoilo en la posición 2c en un medio tamponado. De manera similar, cambiar el aceptor HO-DA mencionado anteriormente por un aceptor HO-DAB adecuado en la reacción de glucosilación, permitió la elongación de la cadena en el último para dar el tetrasacárido CDAB completamente protegido (279), que se convirtió ventajosamente en el aceptor HO-CDAB (280) o al donante CDAB-PTFA (284), como ya fue mencionado.





Esquema 7

Protocolos sintéticos y caracterización de intermedios clave y todos los bloques de construcción novedosos enumerados en la Tabla 1.

Fenil 3,4,6-tri-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-1-tio- β -D-galactopiranosido (24).

- 5 Una solución de tioglucósido 21^[30] (5,00 g, 9,21 mmoles) en MeOH anhidro (100 ml) se trató con MeONa (0,5 M en MeOH, 311 μ l, 1,44 mmoles). La solución se agitó durante 2 h a ta en atmósfera de Ar. La reacción se inactivó con resina Dowex-H⁺. La resina se filtró y el filtrado se evaporó. Se añadieron sucesivamente bromuro de bencilo (6,6 ml, 55,3 mmoles, 6,0 equiv.) y NaH (60% en aceite, 2,21 g, 55,3 mmoles, 6,0 equiv.) a una solución del triol en bruto en DMF anhidro (74 ml) enfriada a -10°C. La mezcla se agitó en atmósfera de Ar manteniendo la temperatura por debajo de 0°C. Después de 1,5 h, la reacción se inactivó con la cantidad mínima de MeOH. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 98:2 a 95:5) para dar el derivado de tri-*O*-bencilo objetivo (24, 4,90 g, 77%), como un sólido blanco.

15 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,56-7,22 (m, 2H, H_{Ar}), 7,40-7,20 (m, 18H, H_{Ar}), 6,84 (d, 1H, $J_{NH,2} = 7,5$ Hz, NH), 5,30 (d, 1H, $J_{1,2} = 10,2$ Hz, H-1), 4,90 (d, 1H, $J = 11,4$ Hz, H_{Bn}), 4,68 (d, 1H, $J = 11,2$ Hz, H_{Bn}), 4,58 (d, 1H, H_{Bn}), 4,54 (d, 1H, H_{Bn}), 4,53 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, H_{Bn}), 4,48 (d, 1H, H_{Bn}), 4,28 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10,5$ Hz, $J_{3,4} = 2,7$ Hz, H-3), 4,09 (d, 1H, H-4), 3,94 (pdt, 1H, H-2), 3,78-3,68 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b).

20 ¹³C RMN (CDCl₃), δ 161,7 (NHCO), 138,4, 137,8, 137,3 (3C, C_{IVAr}), 132,8 (2C, C_{Ar}), 132,2 (C_{IVAr}), 130,0-127,6 (18C, C_{Ar}), 92,5 (CCl₃), 84,3 (C-1), 78,2 (C-3), 77,6 (C-5), 74,5, 73,6 (2C, C_{Bn}), 72,4 (C-4), 72,3 (C_{Bn}), 68,4 (C-6), 53,7 (C-2).

HRMS (ESI⁺): m/z 708,1128 (calculado para C₃₅H₃₄Cl₃NO₅SNa [M+Na]⁺: m/z 708,1121).

N-feniltrifluoroacetimidato de 3,4,6-Tri-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- α/β -D-galactopiranosilo (181).

El hemiacetal (1,85 g, 3,11 mmoles), obtenido a partir del tioglucósido 24, se disolvió en acetona (31 ml). Se añadieron cloruro de *N*-(fenil)trifluoroacetimidilo (1,29 g, 6,22 mmoles) y Cs₂CO₃ (1,12 g, 3,42 mmoles, 1,1 equiv.) a la solución.

La mezcla se agitó durante 4 h a ta. La mezcla de reacción se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 85:15 a 7:3 + 1% de Et₃N) para dar *N*-feniltrifluoroacetimidato 181 (2,10 g, 88%) como un aceite de color amarillo claro.

5 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,61-7,09 (m, 18H, H_{Ar}), 6,77 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz, H_{Ar}), 6,48 (d_o, 1H, *J*_{NH,2} = 7,7 Hz, NH), 6,47 (bs_o, 1H, H-1), 4,97 (d, 1H, *J* = 11,4 Hz, H_{Bn}), 4,76 (d_{po}, 1H, *J* = 11,9 Hz, H_{Bn}), 4,73 (m, 1H, H-2), 4,64 (d, 1H, H_{Bn}), 4,57-4,48 (m, 3H, H_{Bn}), 4,20 (bs, 1H, H-4), 4,07 (pt, 1H, H-5), 3,88 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 11,0 Hz, *J*_{3,4} = 1,4 Hz, H-3), 3,72 (pt, 1H, *J*_{5,6a} = 7,8 Hz, H-6a), 3,62 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 5,7 Hz, *J*_{6a,6b} = 9,1 Hz, H-6b).

¹³C RMN (CDCl₃), δ 161,8 (NHCO), 143,1, 138,0, 137,7, 137,0 (4C, C_{IV} Ar), 129,4-119,3 (20C, C_{Ar}), 94,3 (C-1, ¹*J*_{CH} = 162,9 Hz), 92,3 (CCl₃), 75,5 (C-3), 74,8, 73,7 (2C, C_{Bn}), 72,5 (C-5), 71,6 (C-4), 71,3 (C_{Bn}), 68,1 (C-6), 50,6 (C-2).

10 Alil 4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil-α-*L*-ramnopiranosido (9).^[26] Se añadió Bu₂SnO (37,2 g, 149,5 mmoles, 1,1 equiv.) a una solución del conocido alil 4-*O*-bencil-α-*L*-ramnopiranosido^[31] (40,0 g, 135,8 mmoles) en tolueno anhidro (1,1 L). La mezcla se agitó durante 5 h a reflujo utilizando un aparato "Dean-Stark" y posteriormente se concentró a presión reducida para dar una solución 0,4 M. Después de enfriar a ta, se añadieron sucesivamente CsF seco (21,05 g, 138,6 mmoles, 1,0 equiv.), TBAI seco (65,25 g, 175,6 mmoles, 1,3 equiv.) y PMBCl (20,3 ml, 149,5 mmoles, 1,1 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 5 h a reflujo, momento en el que la monitorización por TLC (Chex/EtOAc 6:4) mostró la conversión del material de partida (rf = 0,22) en un producto menos polar mayoritario (rf = 0,51). La temperatura se redujo a 0°C, las sales se eliminaron por filtración (lavado con tolueno) y los compuestos volátiles se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 9:1 a 7:3) para dar el aceptor 9 (48,1 g, 81%) como un aceite de color amarillo anaranjado. Los datos analíticos fueron como se describe.^[26]

Tricloroacetimidato de 2-*O*-benzoil-4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil-α-*L*-ramnopiranosilo (43).

25 El hemiacetal (7,89 g, 16,49 mmoles) obtenido del conocido glucósido de alilo 9,^[26] benzoilado en la posición 2, se disolvió en DCE (25 ml). Se añadieron tricloroacetimidato (6,6 ml, 66,0 mmoles) y DBU (616 μl, 4,12 mmoles) y la solución se agitó en atmósfera de Ar a ta durante 30 min. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 8:2 + 1% de Et₃N) para dar donante 43 (9,71 g, 95%) como un aceite amarillo.

¹H RMN (CDCl₃), δ 8,70 (s, 1H, NH), 8,13-6,81 (m, 14H, CH_{Ar}), 6,33 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1,9 Hz, H-1), 5,73 (dd, 1H, H-2), 4,95 (d, 1H, *J* = 11,1 Hz, H_{Bn}), 4,76 (d, 1H, *J* = 11,1 Hz, H_{PMB}), 4,68 (d, 1H, H_{Bn}), 4,57 (d, 1H, H_{PMB}), 4,11 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 3,3 Hz, *J*_{3,4} = 9,6 Hz, H-3), 4,03 (dq, 1H, *J*_{4,5} = 9,6 Hz, H-5), 3,80 (s, 3H, CH₃PMB), 3,64 (pt, 1H, H-4), 1,41 (d, 3H, *J*_{5,6} = 6,0 Hz, H-6).

30 ¹³C RMN (CDCl₃), δ 165,8 (CO), 160,2 (C=NH), 159,4 (C_{IV}PMB), 138,2 (C_{IV}Bn), 133,3 (C_{Bz}), 130,0 (C_{IV}PMB), 129,9, 129,7, 128,5, 128,4, 128,3, 127,8, (12C, 11C_{Ar}, C_{IV}Bz), 113,8 (2C, C_{Ar}PMB), 95,4 (C-1), 90,9 (CCl₃), 79,3 (C-4), 77,0 (C-3), 75,5 (C_{Bn}), 71,4 (C_{PMB}), 70,8 (C-5), 68,2 (C-2), 55,2 (CH₃PMB), 18,2 (C-6).

Alil (2-*O*-benzoil-4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil-α-*L*-ramnopiranosil)-(1→2)-3,4-di-*O*-bencil-α-*L*-ramnopiranosido (47).

35 Una mezcla del conocido aceptor de alil 2,4-di-*O*-bencil-α-*L*-ramnósido^[28] (3,00 g, 7,81 mmoles), donante 43 (5,84 g, 9,37 mmoles) y MS 4Å en polvo (6,0 g) en tolueno anhidro (78 ml) se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de Ar durante 1 h. La suspensión se enfrió a -40°C y se añadió TMSOTf (71 μl, 0,39 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a esta temperatura y se añadió Et₃N para inactivar la reacción. La suspensión se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 9:1) para dar el disacárido 47 (6,30 g, 95%) como un aceite amarillo.

45 ¹H RMN (CDCl₃), δ 8,13-8,08 (m, 2H, H_{Ar}), 7,62 (m, 1H, H_{Ar}), 7,53-7,47 (m, 2H, H_{Ar}), 7,37-7,15 (m, 17H, H_{Ar}), 6,83-6,78 (m, 2H, H_{Ar}PMB), 5,89 (m, 1H, CH=Alil), 5,77 (dd, 1H, H-2c), 5,27 (m, 1H, *J*_{trans} = 17,2 Hz, *J*_{gem} = 1,6 Hz, =CH₂Alil), 5,20 (m, 1H, *J*_{cis} = 10,5 Hz, =CH₂Alil), 5,14 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1,8 Hz, H-1c), 4,93 (d, 1H, *J* = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,92 (d, 1H, *J* = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,80 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1,7 Hz, H-1d), 4,78 (d, 1H, *J* = 11,0 Hz, H_{Bn}), 4,71 (bs, 2H, H_{Bn}), 4,67 (d, 1H, *J* = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,63 (d, 1H, *J* = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,54 (d, 1H, *J* = 11,0 Hz, H_{Bn}), 4,15 (m, 1H, H_{Alil}), 4,08 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 3,2 Hz, *J*_{3,4} = 9,3 Hz, H-3c), 4,05 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 2,9 Hz, H-2d), 3,99-3,86 (m, 3H, H_{Alil}, H-3d, H-5c), 3,76 (s, 3H, CH₃PMB), 3,73 (dq, 1H, *J*_{4,5} = 9,2 Hz, *J*_{5,6} = 6,2 Hz, H-5d), 3,54 (pt, 1H, *J*_{4,5} = 9,4 Hz, H-4c), 3,48 (pt, 1H, *J*_{3,4} = 9,4 Hz, H-4d), 1,36 (d, 3H, *J*_{5,6} = 6,2 Hz, H-6c), 1,32 (d, 3H, H-6d).

50 ¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 165,5 (CO_{Bz}), 159,2 (C_{IV}PMB), 113,7 (2C, C_{Ar}PMB), 99,4 (C-1c, ¹*J*_{CH} = 171,0 Hz), 97,9 (C-1d, ¹*J*_{CH} = 170,0 Hz), 55,2 (CH₃PMB).

HRMS (ESI⁺): *m/z* 867,3601 (calculado para C₅₁H₅₆O₁₁Na [M+Na]⁺: *m/z* 867,3720).

Alil (4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil-α-*L*-ramnopiranosil)-(1→2)-3,4-di-*O*-bencil-α-*L*-ramnopiranosido (48).

Una solución de disacárido 47 (6,27 g, 7,42 mmoles) en MeOH anhidro (74 ml) se trató con MeONa metanólico 0,5 M (7,4 ml, 3,7 mmoles) a 60°C. La mezcla se agitó a esta temperatura en atmósfera de Ar durante 3 h, luego a ta durante

16 h. La mezcla de reacción se neutralizó mediante la adición de resina Dowex-H⁺. La suspensión se filtró y los compuestos volátiles se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 8:2) para dar aceptor 48 (5,2 g, 94%) como una espuma blanca.

5 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,39-7,27 (m, 17H, H_{Ar}), 6,91-6,87 (m, 2H, H_{ArPMB}), 5,88 (m, 1H, CH=AlI), 5,27 (m, 1H, J_{trans} = 17,2 Hz, J_{gem} = 1,6 Hz, =CH₂AlI), 5,19 (m, 1H, J_{cis} = 10,4 Hz, =CH₂AlI), 5,09 (d, 1H, J_{1,2} = 1,5 Hz, H-1c), 4,89 (d, 2H, J = 11,0 Hz, H_{Bn}), 4,78 (d, 1H, J_{1,2} = 1,7 Hz, H-1D), 4,71 (d, 1H, J = 11,6 Hz, H_{Bn}), 4,67 (bs_o, 2H, H_{Bn}), 4,66 (d, 1H, J = 11,6 Hz, H_{Bn}), 4,65 (d_{po}, 1H, J = 11,3 Hz, H_{Bn}), 4,63 (d, 1H, J = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,17-4,10 (m, 2H, H_{All}, H-2c), 4,05 (dd, 1H, J_{2,3} = 2,9 Hz, H-2D), 3,98-3,86 (m, 3H, H-3c, H_{All}, H-3D), 3,82 (dq, 1H, J_{4,5} = 9,6 Hz, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-5c), 3,80 (s, 3H, CH₃PMB), 3,71 (dq, 1H, J_{4,5} = 9,4 Hz, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-5D), 3,46 (pt_{po}, 1H, J_{3,4} = 9,3 Hz, H-4c), 3,41 (pt, 1H, J_{3,4} = 9,7 Hz, H-4D), 2,46 (d, 1H, J_{OH,2} = 1,8 Hz, OH-2c), 1,32 (d, 3H, H-6b), 1,31 (d, 3H, H-6c).

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 159,4 (C_{IVPMB}), 114,0 (2C, C_{ArPMB}), 100,7 (C-1c, ¹J_{CH} = 171,7 Hz), 98,0 (C-1D, ¹J_{CH} = 170,1 Hz), 55,2 (CH₃PMB).

HRMS (ESI⁺): *m/z* 763,3458 (calculado para C₄₄H₅₂O₁₀Na [M+Na]⁺: *m/z* 763,3449).

Tricloroacetimidato de 4-*O*-bencilo-2-*O*-levulinoil-3-*O*-*para*-metoxibencil-α/β-L-ramnopiranosilo (119).

15 El hemiacetal (10,0 g, 21,16 mmoles) obtenido del conocido glucósido de alilo 9,^[26] levulinoilado en la posición 2, se disolvió en DCE anhidro (42 ml) y se agitó en atmósfera de Ar. Se añadieron tricloroacetimidato (10,6 ml, 105,8 mmoles) y DBU (0,95 ml, 6,3 mmoles) a ta. La mezcla de reacción se purificó como tal mediante cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 7:3 a 1:1 + 1% de Et₃N) para dar una mezcla α/β 7,5:1 de tricloroacetimidato. 119 (12,66 g, 97%) como un aceite de color amarillo claro (relación α/β 7,5:1).

20 ¹H RMN (CDCl₃), δ 8,67 (s, 1H, NH), 7,41-7,26 (m, 7H, H_{Ar}), 6,89-6,84 (m, 2H, J = 8,7 Hz, H_{ArPMB}), 6,19 (d, 1H, J_{1,2} = 1,9 Hz, H-1), 5,47 (dd, 1H, J_{2,3} = 3,3 Hz, H-2), 4,94 (d, 1H, J = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,66 (d, 1H, J = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,65 (d, 1H, H_{Bn}), 4,51 (d, 1H, H_{Bn}), 3,98 (dd, 1H, J_{3,4} = 9,6 Hz, H-3), 3,94 (dq, 1H, J_{4,5} = 9,4 Hz, H-5), 3,82 (s, 3H, CH₃PMB), 3,50 (pt, 1H, H-4), 2,84-2,72 (m, 4H, CH₂lev), 2,22 (s, 3H, CH₃lev), 1,36 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6).

25 ¹³C RMN (CDCl₃), δ 206,3 (CO_{lev}), 171,9 (CO_{2lev}), 160,1 (C=NH), 159,4 (C_{IVArPMB}), 138,1 (C_{IVAr}), 130,0-127,9 (8C, 7C_{Ar}, C_{IVArPMB}), 113,8 (2C, C_{ArPMB}), 95,1 (C-1), 90,8 (CCl₃), 79,2 (C-4), 76,6 (C-3), 75,6 (C_{Bn}), 71,5 (C_{PMB}), 70,7 (C-5), 67,8 (C-2), 55,3 (CH₃PMB), 38,0 (COCH₂lev), 29,9 (CH₃lev), 28,1 (CO₂CH₂lev), 18,0 (C-6).

N-feniltrifluoroacetimidato de 4-*O*-bencilo-3-*O*-*para*-metoxibencil-2-*O*-levulinoil-α/β-L-ramnopiranosilo (166).

30 El hemiacetal (5,0 g, 10,58 mmoles) obtenido del conocido glucósido de alilo 9,^[26] levulinoilado en la posición 2, se disolvió en acetona (36 ml). Se añadieron cloruro de *N*-(fenil)trifluoroacetimidato (4,39 g, 21,2 mmoles) y Cs₂CO₃ (3,79 g, 11,6 mmoles) a la solución. La mezcla se agitó durante 4 h a ta. La mezcla de reacción se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 9:1 a 7:3 + 1% de Et₃N) para dar una mezcla α/β 5:1 de *N*-feniltrifluoroacetimidato 166 (6,70 g, 98%) como un aceite de color amarillo claro.

35 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,42-6,81 (m, 14H, H_{Ar}), 6,17 (bs, 1H, H-1), 5,46 (bs, 1H, H-2), 4,94 (d, 1H, J = 10,6 Hz, H_{Bn}), 4,70-4,62 (m, 2H, H_{Bn}), 4,53 (d, 1H, J = 10,6 Hz, H_{Bn}), 3,98 (dd, 1H, J_{2,3} = 3,3 Hz, J_{3,4} = 9,6 Hz, H-3), 3,90 (dq, 1H, J_{4,5} = 9,1 Hz, J_{5,6} = 6,1 Hz, H-5), 3,83 (s, 3H, CH₃PMB), 3,49 (pt, 1H, H-4), 2,82-2,69 (m, 4H, CH₂lev), 2,21 (s, 3H, CH₃lev), 1,32 (d, 3H, H-6).

¹³C RMN (CDCl₃, parcial), δ 206,2 (CO_{lev}), 171,8 (CO_{2lev}), 159,4 (C_{IVArPMB}), 143,3, 138,1 (2C, C_{IVAr}), 130,0-119,4 (13C, 12C_{Ar}, C_{IVArPMB}), 113,8 (2C, C_{ArPMB}), 93,9 (C-1), 79,2 (C-4), 76,9 (C-3), 75,6 (C_{Bn}), 71,7 (C_{PMB}), 70,4 (C-5), 67,8 (C-2), 55,3 (CH₃PMB), 38,0 (COCH₂lev), 29,9 (CH₃lev), 28,0 (CO₂CH₂lev), 18,0 (C-6).

40 Alil (2,3-di-*O*-bencil-β-α-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1→3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosido (242).

45 Se añadieron TEMPO (171 mg, 1,10 mmoles) y BAIB (4,41 g, 13,69 mmoles) a una solución de diol 241 (4,86 g, 5,48 mmoles) en DCM/H₂O (2:1, 99 ml) agitada vigorosamente a ta. Después de 1,5 h, la reacción se inactivó mediante la adición de una disolución acuosa al 10% de NaHSO₃. La mezcla bifásica se diluyó con DCM y las fases se separaron. La fase ac. se acidificó con una solución ac. al 10% de solución de HCl y se volvió a extraer dos veces con DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron pasándolos a través de un filtro separador de fases y se concentraron. Se añadieron bromuro de bencilo (2,4 ml, 21,9 mmoles, 4,0 equiv.) y KHCO₃ (2,12 g, 21,9 mmoles, 4,0 equiv.) al producto intermedio en bruto en DMF seca (82 ml) y la mezcla de reacción se agitó en atmósfera de Ar durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y EtOAc. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc de 9:1 a 85:15) para dar el uronato de bencilo 242 (4,25 g, 78%) como un sólido blanco.

50 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,44-7,24 (m, 25H, H_{Ar}), 6,86 (d, 1H, J_{NH,2} = 6,7 Hz, NH), 5,88 (m, 1H, CH=AlI), 5,27 (m, 1H, J_{trans} = 17,3 Hz, J_{gem} = 1,5 Hz, =CH₂AlI), 5,26 (bs, 2H, H_{CO2Bn}), 5,18 (m, 1H, J_{cis} = 10,4 Hz, =CH₂AlI), 5,05 (d, 1H, J_{1,2} = 8,3 Hz, H-1B), 5,01 (d, 1H, J = 11,8 Hz, H_{Bn}), 4,79 (d, 1H, J = 11,6 Hz, H_{Bn}), 4,74 (d_{po}, 1H, J = 11,9 Hz, H_{Bn}), 4,73 (bs_o, 2H, H_{Bn}),

ES 2 922 818 T3

4,71 (d_{po}, 1H, *J* = 11,9 Hz, H_{Bn}), 4,68 (dd_{po}, 1H, *J*_{2,3} = 11,1 Hz, *J*_{3,4} = 3,1 Hz, H-3_B), 4,52 (d_{po}, 1H, *J* = 11,9 Hz, H_{Bn}), 4,49 (d_{po}, 1H, *J*_{1,2} = 7,7 Hz, H-1_A), 4,46 (d, 1H, *J* = 11,9 Hz, H_{Bn}), 4,39-4,33 (m, 2H, H_{All}, H-4_A), 4,25 (d, 1H, H-4_B), 4,12-4,05 (m, 2H, H_{All}, H-5_A), 3,76-3,67 (m, 2H, H-2_B, H-5_B), 3,67-3,61 (m, 2H, H-2_A, H-6_{aB}), 3,53 (dd_{po}, 1H, *J*_{5,6b} = 5,9 Hz, *J*_{6a,6b} = 10,9 Hz, H-6_{bB}), 3,50 (dd_{po}, 1H, *J*_{2,3} = 9,2 Hz, *J*_{3,4} = 3,4 Hz, H-3_A), 2,32 (bs, 1H, OH-4_A).

5 ¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 167,3 (C-6_A), 162,1 (NHCO), 103,7 (C-1_A), 97,5 (C-1_B), 92,2 (CCl₃), 67,1 (C_{CO2Bn}).

HRMS (ESI⁺): *m/z* 1012,2621 (calculado para C₅₂H₅₄Cl₃NO₁₂Na [M+Na]⁺: *m/z* 1012,2609).

(2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinoil-β-D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1→3)-tricloroacetimidato de 4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-α-D-galactopiranosilo (246).

10 Se añadieron ácido levulínico (1,03 ml, 10,09 mmoles), DCC (1,87 g, 9,08 mmoles) y DMAP (123 mg, 1,01 mmoles) a una solución de uronato 242 (5,00 g, 5,04 mmoles) en DCM anhidro (50 ml). La solución se agitó en atmósfera de Ar durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un tapón de Celite®, se diluyó con DCM y se lavó sucesivamente con una solución de HCl ac. al 10%, una solución de NaHCO₃ sat. ac. y salmuera, se secó pasándola por un filtro separador de fases y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc de 9:1 a 85:15) para dar el disacárido 244 completamente protegido (4,99 g, 91%) como un sólido amarillo claro.

15 Se disolvió hexafluorofosfato de 1,5-ciclooctadienobis(metilfenilfosfina)-iridio (194 mg, 230 μmoles) en THF anhidro (60 ml). Se burbujeó hidrógeno a través de la solución durante 15 min y la solución amarilla resultante se concentró hasta sequedad. El residuo se recogió en THF anhidro (92 ml) y se añadió una solución del disacárido 244 totalmente protegido (4,99 g, 4,58 mmoles) en THF anhidro (92 ml). La mezcla se agitó durante 2 h a ta en atmósfera de Ar. Se añadió una solución de yodo (2,33 g, 9,16 mmoles) en THF/H₂O (4:1, 110 ml) y se prosiguió la agitación durante 2 h a ta. La reacción se inactivó mediante la adición de una solución recién preparada de bisulfito de sodio ac. al 10%. La mezcla se concentró a 1/3 del volumen a presión reducida y la fase ac. se extrajo tres veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron pasándolas a través de un filtro separador de fases y se evaporaron hasta sequedad. El aceite resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 7:3) para dar el hemiacetal correspondiente 245 (4,80 g, qqtivo) en una relación α/β de 6,7:1 como una espuma de color amarillo claro.

25 Se añadieron sucesivamente tricloroacetronitrilo (193 μL, 1,92 mmoles) y DBU (17 μL, 0,12 mmoles) a una solución del hemiacetal resultante (245, 403 mg, 380 μmoles) en DCM anhidro (7,7 ml). La mezcla se agitó durante 30 min a ta en atmósfera de Ar. Después de la concentración a 1/3 del volumen (presión reducida, ta), la mezcla de reacción se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 7:3 + 1% de Et₃N) para dar tricloroacetimidato 246 (412 mg, 91%) en una relación α/β de 12:1 como una espuma blanca. El isómero α tenía:

30 ¹H RMN (CDCl₃), δ 8,74 (s, 1H, =NH), 7,44-7,22 (m, 25H, H_{Ar}), 6,75 (d, 1H, *J*_{NH,2} = 8,7 Hz, NH), 6,55 (d, 1H, *J*_{1,2} = 3,6 Hz, H-1_B), 5,85 (bdd, 1H, H-4_A), 5,20 (d, 1H, *J* = 11,8 Hz, H_{CO2Bn}), 5,16 (d, 1H, H_{CO2Bn}), 5,12 (d, 1H, *J* = 11,8 Hz, H_{Bn}), 4,96 (ddd, 1H, *J*_{2,3} = 11,1 Hz, H-2_B), 4,90 (d, 1H, *J* = 12,2 Hz, H_{Bn}), 4,75-4,68 (m, 4H, 3H_{Bn}, H-1_A), 4,60 (bd, 1H, H-4_B), 4,50-4,46 (m, 2H, H_{Bn}), 4,42 (d, 1H, *J* = 11,7 Hz, H_{Bn}), 4,27 (d, 1H, *J*_{4,5} = 1,2 Hz, H-5_A), 4,22 (t, 1H, *J*_{5,6a} = *J*_{5,6b} = 6,4 Hz, H-5_B), 4,15 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 11,0 Hz, *J*_{3,4} = 2,7 Hz, H-3_B), 3,65-3,60 (m, 4H, H-6_{aB}, H-6_{bB}, H-2_A, H-3_A), 2,57-2,37 (m, 4H, CH_{2lev}), 1,99 (s, 3H, CH_{3lev}),

35 ¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 205,7 (C_{Olev}), 171,2 (C_{O2lev}), 165,9 (C-6_A), 161,9 (NHCO), 160,2 (C=NH), 104,5 (C-1_A), 95,3 (C-1_B), 92,3 (CCl_{3C(O)NH}), 91,0 (CCl_{3C(O)NH}), 67,7 (C_{CO2Bn}), 37,8 (CH_{2lev}), 29,5 (CH_{3lev}), 27,9 (CH_{2lev}).

2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinoil-β-D-galactopiranosiluronato de bencilo-(1→3)-*N*-feniltrifluoroacetimidato de 4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-α-β-D-galactopiranosilo (247).

40 El hemiacetal 245 obtenido del aceptor 242 como se describe anteriormente (5,67 g, 5,40 mmoles) se disolvió en acetona (59 ml). Se añadieron cloruro de *N*-(fenil)trifluoroacetimidato (2,24 g, 10,8 mmoles) y Cs₂CO₃ (1,94 g, 5,94 mmoles) y la mezcla se agitó durante 1,5 h a ta. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 8:2 a 7:3 + 1% de Et₃N) para dar el donante 247 (5,38 g, 89%) en una relación α/β de 13:1 como una espuma blanca.

45 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,43-7,22 (m, 27H, H_{Ar}), 7,10 (m, 1H, H_{Ar}), 6,76 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz, H_{Ar}), 6,72 (d, 1H, *J*_{NH,2} = 8,2 Hz, NH-2_B), 6,52 (bs, 1H, H-1_B), 5,87 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 2,8 Hz, *J*_{4,5} = 1,2 Hz, H-4_A), 5,23 (d, 1H, *J* = 11,8 Hz, H_{CO2Bn}), 5,18 (d, 1H, H_{CO2Bn}), 5,07 (d, 1H, *J* = 11,6 Hz, H_{Bn}), 4,89 (d, 1H, *J* = 12,1 Hz, H_{Bn}), 4,84 (m, 1H, H-2_B), 4,75 (d, 1H, *J* = 11,0 Hz, H_{Bn}), 4,73 (d_{po}, 1H, *J* = 12,6 Hz, H_{Bn}), 4,71 (bs_o, 1H, H_{Bn}), 4,69 (d, 1H, *J*_{1,2} = 6,0 Hz, H-1_A), 4,55 (bd, 1H, H-4_B), 4,52 (d, 1H, *J* = 11,7 Hz, H_{Bn}), 4,50 (d, 1H, *J* = 11,0 Hz, H_{Bn}), 4,46 (d, 1H, *J* = 11,7 Hz, H_{Bn}), 4,29 (d, 1H, H-5_A), 4,18-4,12 (m, 2H, H-5_B, H-3_B), 3,68-3,59 (m, 3H, H-6_{aB}, H-2_A, H-3_A), 3,54 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 6,3 Hz, *J*_{6a,6b} = 9,8 Hz, H-6_{bB}), 2,61-2,39 (m, 4H, CH_{2lev}), 2,00 (s, 3H, CH_{3lev}).

55 ¹³C RMN (CDCl₃), δ 205,7 (C_{Olev}), 171,3 (C_{O2lev}), 165,9 (C-6_A), 162,0 (NHCO), 143,1, 138,7, 138,1, 138,0, 137,3, 135,0 (6C, C_{IVAr}), 129,0-119,2 (30C, C_{Ar}), 104,4 (C-1_A), 94,2 (C-1_B), 92,3 (CCl₃), 78,6 (C-2_A), 77,3, 77,2 (2C, C-3_B, C-3_A), 75,8 (C-4_B), 75,0, 74,8, 73,4 (3C, C_{Bn}), 72,5 (C-5_A), 72,4 (C-5_B), 72,2 (C_{Bn}), 68,9 (C-6_B), 67,7 (C_{CO2Bn}), 67,5 (C-4_A), 50,7 (C-2_B), 37,8 (CH_{2lev}), 29,5 (CH_{3lev}), 27,9 (CH_{2lev}).

Alil (3,4-di-*O*-bencil-2-*O*-levuliniloil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosido (277).

Una mezcla de aceptor 242 (7,26 g, 7,32 mmoles), conocido tricloroacetimidato de 3,4-di-*O*-bencil-2-*O*-levuliniloil- α -L-ramnopiranosilo^[28] (5,59 g, 9,52 mmoles) y MS 4Å en polvo (10,9 g) en tolueno anhidro (146 ml) se agitó a ta en atmósfera de Ar durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió a -10°C y se añadió TMSOTf (66 μ L, 370 μ moles). Después de 20 min, la reacción se inactivó con Et₃N. Los sólidos se filtraron y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 9:1 a 8:2) para dar trisacárido 277 (9,19 g, 89%) como una espuma blanca.

¹H RMN (CDCl₃), δ 7,43-7,10 (m, 35H, H_{Ar}), 6,90 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ = 6,7 Hz, NH), 5,89 (m, 1H, CH=AlI), 5,46 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 1,9 Hz, $J_{3,4}$ = 3,0 Hz, H-2_D), 5,28 (m_o, 1H, J_{trans} = 17,2 Hz, J_{gem} = 1,5 Hz, =CH₂AlI), 5,27 (d_o, 1H, H_{CO₂Bn}), 5,19 (d_o, 1H, H-1_D), 5,18 (m_o, 1H, J_{cis} = 10,4 Hz, =CH₂AlI), 5,15 (d, 1H, J = 12,2 Hz, H_{CO₂Bn}), 5,04 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 8,3 Hz, H-1_B), 4,96 (d, 1H, J = 11,7 Hz, H_{Bn}), 4,84 (d, 1H, J = 11,2 Hz, H_{Bn}), 4,82 (s, 2H, H_{Bn}), 4,76 (s, 2H, H_{Bn}), 4,67 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3}$ = 10,9 Hz, $J_{3,4}$ = 3,3 Hz, H-3_B), 4,66 (d_{po}, 1H, J = 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,58 (d, 1H, J = 11,1 Hz, H_{Bn}), 4,53 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7,6 Hz, H-1_A), 4,49-4,44 (m, 2H, H_{Bn}, H-4_A), 4,42 (d, 1H, J = 12,0 Hz, H_{Bn}), 4,37 (m_{po}, 1H, H_{AlI}), 4,33 (d_{po}, 1H, J = 10,7 Hz, H_{Bn}), 4,24 (bd, 1H, H-4_B), 4,13-4,07 (m, 2H, H_{AlI}, H-5_A), 3,95 (d, 1H, J = 10,8 Hz, H_{Bn}), 3,77 (dq_{po}, 1H, $J_{4,5}$ = 9,8 Hz, H-5_D), 3,77-3,67 (m, 4H, H-3_D, H-2_B, H-2_A, H-5_B), 3,60 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ = 6,6 Hz, $J_{6a,6b}$ = 10,0 Hz, H-6_{AB}), 3,52 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 9,7 Hz, $J_{3,4}$ = 2,8 Hz, H-3_A), 3,38-3,32 (m, 2H, H-6_B, H-4_D), 2,71-2,61 (m, 4H, CH₂lev), 2,16 (s, 3H, CH₃lev), 1,33 (d, 3H, $J_{5,6}$ = 6,2 Hz, H-6_D).

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 206,1 (CO_{lev}), 171,5 (CO₂lev), 167,0 (C-6_A), 162,2 (NHCO), 103,9 (C-1_A, $^1J_{\text{CH}}$ = 163,6 Hz), 98,9 (C-1_D, $^1J_{\text{CH}}$ = 170,6 Hz), 97,5 (C-1_B, $^1J_{\text{CH}}$ = 163,2 Hz), 92,3 (CCl₃), 67,4 (C_{CO₂Bn}), 57,0 (C-2_B), 38,1 (COCH₂lev), 29,8 (CH₃lev), 28,2 (CO₂CH₂lev).

HRMS (ESI⁺): m/z 1436,4559 (calculado para C₇₇H₈₂Cl₃NO₁₈Na [M+Na]⁺: m/z 1436,4495).

(3,4-Di-*O*-bencil-2-*O*-levuliniloil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-*N*-feniltrifluoroacetimidato de 4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- α/β -D-galactopiranosilo (283).

Hexafluorofosfato de 1,5-ciclooctadienobis(metilfenilfosfina)-iridio (91 mg, 0,11 mmoles) se disolvió en THF anhidro (43 ml) y se burbujeó hidrógeno a través de la solución durante 15 min (H-cubo, modo H₂ completo). La solución amarilla resultante se evaporó hasta sequedad. El residuo se recogió en THF anhidro (43 ml) y se vertió en una solución de glucósido de alilo 277 (3,05 g, 2,15 mmoles) en THF anhidro (43 ml). La mezcla se agitó bajo Ar a ta durante 2 h. Se añadió una solución de yodo (1,09 g, 4,31 mmoles) en THF/H₂O (4:1, 52 ml) y la mezcla se agitó durante 1,5 h a ta. La reacción se inactivó con bisulfito de sodio ac. al 10%. La mezcla se concentró a 1/3 del volumen y la fase ac. se extrajo dos veces con EtOAc. Las fases orgánicas se agruparon, se lavaron con salmuera, se seccionaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 7:3) para dar el correspondiente hemiacetal 281 (2,84 g, 96%) como una espuma de color amarillo claro. (α/β , 7,5:1).

Este hemiacetal (2,74 g, 2,0 mmoles) se disolvió en acetona (20 ml). Se añadieron cloruro de *N*-(fenil)trifluoroacetimidato (827 mg, 3,98 mmoles) seguido de Cs₂CO₃ (714 mg, 2,19 mmoles) a la solución. La mezcla se agitó durante 2 h a ta. Se añadió más C₂CO₃ (649 mg, 2,0 mmoles). Después de 1 h, la mezcla de reacción se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 65:35 a 6:4 + 1% de Et₃N) para dar una mezcla α/β 7:1 de *N*-feniltrifluoroacetimidato 283 (3,00 g, 97%) como una espuma de color amarillo claro.

¹H RMN (CDCl₃), δ 7,63-7,05 (m, 38H, H_{Ar}), 6,74 (d, 2H, J = 7,5 Hz, H_{Ar}), 6,68 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ = 8,3 Hz, NH), 6,50 (bs, 1H, H-1_B), 5,38 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 2,0 Hz, $J_{2,3}$ = 3,1 Hz, H-2_D), 5,26 (d, 1H, J = 12,0 Hz, H_{CO₂Bn}), 5,10 (d_o, 1H, H-1_D), 5,11 (d_{po}, 1H, H_{CO₂Bn}), 4,98 (d, 1H, J = 11,6 Hz, H_{Bn}), 4,91 (d, 1H, J = 12,2 Hz, H_{Bn}), 4,86-4,71 (m, 5H, H-2_B, 4H_{Bn}), 4,64 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7,5 Hz, H-1_A), 4,55 (d, 1H, J = 11,1 Hz, H_{Bn}), 4,53 (d, 1H, J = 11,6 Hz, H_{Bn}), 4,48 (d_{po}, 1H, $J_{3,4}$ = 3,2 Hz, H-4_B), 4,47 (d_o, 1H, J = 11,7 Hz, H_{Bn}), 4,45 (bd_o, 1H, H-4_A), 4,41 (d, 1H, J = 12,1 Hz, H_{Bn}), 4,23 (d, 1H, J = 10,6 Hz, H_{Bn}), 4,16 (d, 1H, $J_{4,5}$ = 0,8 Hz, H-5_A), 4,12-4,05 (m, 2H, H-5_B, H-3_B), 3,81 (d, 1H, J = 10,7 Hz, H_{Bn}), 3,77 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3}$ = 9,5 Hz, H-2_A), 3,73 (dq_{po}, 1H, $J_{4,5}$ = 9,6 Hz, H-5_D), 3,63 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 3,2 Hz, $J_{3,4}$ = 9,4 Hz, H-3_D), 3,59 (dd_{po}, 1H, $J_{3,4}$ = 2,7 Hz, H-3_A), 3,56 (dd_{po}, 1H, $J_{5,6a}$ = 6,7 Hz, $J_{6a,6b}$ = 10,3 Hz, H-6_{AB}), 3,36 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ = 5,2 Hz, H-6_B), 3,31 (pt, 1H, H-4_D), 2,71-2,59 (m, 4H, CH₂lev), 2,15 (s, 3H, CH₃lev), 1,30 (d, 3H, $J_{5,6}$ = 6,2 Hz, H-6_D).

¹³C RMN (CDCl₃), δ 206,1 (CO_{lev}), 171,4 (CO₂lev), 166,8 (C-6_A), 161,9 (NHCO), 104,9 (C-1_A), 99,0 (C-1_D), 94,0 (C-1_B), 92,3 (CCl₃), 67,6 (C_{CO₂Bn}), 38,1 (COCH₂lev), 29,8 (CH₃lev), 28,2 (CO₂CH₂lev).

Alil (4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil-2-*O*-levuliniloil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosido (XX).

A una solución del trisacárido completamente protegido 277 (8,84 g, 6,24 mmoles) en piridina anhidra (52 ml) agitada a 0°C en atmósfera de Ar se añadió gota a gota AcOH (35 ml) seguido de monohidrato de hidracina (1,52 ml, 31,2 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h permitiendo que el baño de enfriamiento alcanzara la ta. Después de la adición de DCM y agua, se separaron las dos fases y la ac. se volvió a extraer dos veces con DCM. Los extractos

orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron pasándolos a través de un filtro separador de fases y los compuestos volátiles se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc de 75:25 a 7:3) para dar el aceptor correspondiente (7,56 g, 92%) como una espuma blanca.

- 5 Una mezcla de este aceptor (7,03 g, 5,34 mmoles), donante de tricloroacetimidato 119 (3,96 g, 6,42 mmoles) y MS 4A en polvo (10,6 g) en tolueno anhidro (134 ml) se agitó a ta en atmósfera de Ar durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió a -10°C y se añadió TMSOTf (48 µL, 267 µmoles). Después de 30 min, la reacción se inactivó con Et₃N. Los sólidos se filtraron y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 95:5 a 8:2) para dar tetrasacárido 279 (8,66 g, 91%) como una espuma blanca.

- 10 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,45-7,11 (m, 42H, H_{Ar}), 6,89-6,84 (m, 3H, 2H_{ArPMB}, NH), 5,88 (m, 1H, CH=AlI), 5,49 (dd, 1H, J_{1,2}= 1,8 Hz, H-2C), 5,31 (d, 1H, J_{1,2}= 1,6 Hz, H-1D), 5,26 (d_{po}, 1H, J= 12,1 Hz, HCO₂Bn), 5,25 (m_{po}, 1H, J_{trans}= 17,2 Hz, J_{gem}= 1,5 Hz, =CH₂AlI), 5,17 (m, 1H, J_{cis}= 10,4 Hz, =CH₂AlI), 5,13 (d, 1H, HCO₂Bn), 5,03 (d, 1H, J_{1,2}= 8,5 Hz, H-1B), 4,97 (d_{po}, 1H, J= 11,6 Hz, H_{Bn}), 4,96 (bso, 1H, H-1C), 4,90 (d, 1H, J= 10,9 Hz, H_{Bn}), 4,82 (d, 1H, J= 11,0 Hz, H_{Bn}), 4,79 (d_{po}, 1H, J= 12,4 Hz, H_{Bn}), 4,77 (bso, 2H, H_{Bn}), 4,68-4,61 (m, 6H, 5H_{Bn}, H-3B), 4,58 (d, 1H, J= 11,7 Hz, H_{Bn}), 4,49 (d, 1H, J_{1,2}= 7,6 Hz, H-1A), 4,47 (d, 1H, J= 11,9 Hz, H_{Bn}), 4,43 (d, 1H, J= 12,1 Hz, H_{Bn}), 4,40 (bd, 1H, H-4A), 4,36 (m, 1H, H_{AlI}), 4,25 (d, 1H, J_{3,4}= 3,0 Hz, H-4B), 4,22 (d, 1H, J= 11,4 Hz, H_{Bn}), 4,14 (d, 1H, J= 11,4 Hz, H_{Bn}), 4,12-4,04 (m, 3H, H_{AlI}, H-2D), 4,04 (d, 1H, J_{4,5}= 0,6 Hz, H-5A), 3,87 (dd, 1H, J_{2,3}= 3,2 Hz, J_{3,4}= 9,1 Hz, H-3C), 3,83 (dq, 1H, J_{4,5}= 9,4 Hz, J_{5,6}= 6,2 Hz, H-5C), 3,78 (s, 3H, CH₃PMB), 3,73-3,63 (m, 5H, H-5D, H-3D, H-2B, H-2A, H-5B), 3,61 (dd, 1H, J_{5,6a}= 6,6 Hz, J_{6a,6b}= 10,0 Hz, H-6aB), 3,47 (dd_{po}, 1H, J_{2,3}= 9,7 Hz, J_{3,4}= 2,7 Hz, H-3A), 3,45 (pt_{po}, 1H, H-4C), 3,39 (dd, 1H, J_{5,6b}= 5,5 Hz, H-6bB), 3,37 (pt, 1H, H-4D), 2,79-2,66 (m, 4H, CH₂lev), 2,19 (s, 3H, CH₃lev), 1,32 (d, 3H, J_{5,6}= 6,2 Hz, H-6D), 1,22 (d, 3H, H-6C).

- 15 ¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 206,1 (CO_{lev}), 171,7 (CO₂lev), 167,0 (C-6A), 162,1 (NHCO), 159,4 (C_{IVArPMB}), 113,9 (2C, C_{ArPMB}), 103,9 (C-1A), 100,7 (C-1C), 100,2 (C-1D), 97,5 (C-1B), 92,3 (CCl₃), 67,4 (C_{CO2Bn}), 55,2 (CH₃PMB), 38,2 (COCH₂lev), 29,8 (CH₃lev), 28,3 (CO₂CH₂lev).

HRMS (ESI⁺): m/z 1792,6085 (calculado para C₉₈H₁₀₆Cl₃NO₂₃Na [M+Na]⁺: m/z 1792,6119).

- 25 (4-O-Bencilo-3-O-para-metoxibencil-2-O-levulinoil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-O-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(2,3-di-O-bencil-β-D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1→3)-N-feniltrifluoroacetimidato de 4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-α/β-D-galactopiranosilo (284).

- 30 Se disolvió hexafluorofosfato de ciclooctadienobis(metildifenilfosfina)-iridio (97 mg, 0,11 mmoles) en THF anhidro (46 mL) y se burbujeó hidrógeno a través de la solución durante 15 min (H-cubo, modo H₂ completo). La solución amarilla resultante se evaporó hasta sequedad. El residuo se recogió en THF anhidro (46 ml) y se vertió en una solución del glucósido de alilo 279 (4,05 g, 2,29 mmoles) en THF anhidro (46 ml). La mezcla se agitó en Ar a ta durante 3,5 h. Se añadió una solución de yodo (1,16 g, 4,57 mmoles) en THF/H₂O (4:1, 55 ml) y la mezcla se agitó durante 1,5 h a ta. La reacción se inactivó con bisulfito de sodio ac. al 10%. La mezcla se concentró a 1/3 del volumen y la fase ac. se extrajo dos veces con EtOAc. Las fases orgánicas se agruparon, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 75:25 a 6:4) para dar el hemiacetal correspondiente (3,85 g, 97%) como un sólido amarillo claro (α/β, 5:1).

- 35 Este hemiacetal (3,73 g, 2,15 mmoles) se disolvió en acetona (43 ml). Se añadieron cloruro de N-(fenil)trifluoroacetimidoilo (893 mg, 4,30 mmoles) seguido de Cs₂CO₃ (1,40 g, 4,30 mmoles) a la solución. La mezcla se agitó durante 2 h a ta. La mezcla de reacción se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 75:25 a 6:4 + 1% de Et₃N) para dar una mezcla α/β 5:1 de N-feniltrifluoroacetimidato 284 (3,66 g, 89%) como una espuma blanca.

- 40 ¹H RMN (CDCl₃), δ 7,46-7,05 (m, 45H, H_{Ar}), 6,87-6,82 (m, 2H, H_{ArPMB}), 6,77-6,72 (m, 2H, H_{Ar}), 6,67 (d, 1H, J_{NH,2}= 8,3 Hz, NH), 6,50 (bs, 1H, H-1B), 5,47 (dd, 1H, J_{1,2}= 1,9 Hz, J_{2,3}= 3,1 Hz, H-2C), 5,27 (s_o, 1H, H-1D), 5,26 (d, 1H, J= 12,1 Hz, HCO₂Bn), 5,11 (d, 1H, HCO₂Bn), 5,03 (d, 1H, J= 11,4 Hz, H_{Bn}), 4,94-4,85 (m, 3H, 2H_{Bn}, H-2B), 4,84-4,72 (m, 4H, 3H_{Bn}, H-1C), 4,65 (2d_o, 2H, J= 11,5 Hz, H_{Bn}), 4,63-4,55 (m, 4H, 3H_{Bn}, H-1A), 4,51 (bd, 1H, J_{3,4}= 2,4 Hz, H-4B), 4,50-4,42 (m, 4H, H_{Bn}), 4,41 (bd_{po}, 1H, J_{3,4}= 3,6 Hz, H-4A), 4,13-4,06 (m, 4H, H_{Bn}, H-5B, H-5A, H-3B), 4,04 (d, 1H, J= 11,6 Hz, H_{Bn}), 3,94-3,89 (m, 2H, H-2D, H-3C), 3,81 (dq, 1H, J_{4,5}= 9,4 Hz, J_{5,6}= 6,3 Hz, H-5C), 3,77 (s, 3H, CH₃PMB), 3,73 (dd, 1H, J_{1,2}= 7,5 Hz, J_{2,3}= 10,0 Hz, H-2A), 3,67 (dq, 1H, J_{4,5}= 9,4 Hz, J_{5,6}= 6,2 Hz, H-5D), 3,62-3,52 (m, 3H, H-3D, H-6aB, H-3A), 3,43-3,33 (m, 3H, H-4C, H-4D, H-6bB), 2,77-2,67 (m, 4H, CH₂lev), 2,19 (s, 3H, CH₃lev), 1,29 (d, 3H, H-6D), 1,20 (d, 3H, H-6C).

- 50 ¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 206,1 (CO_{lev}), 171,6 (CO₂lev), 166,8 (C-6A), 162,0 (NHCO), 159,2 (C_{IVArPMB}), 143,1 (C=NPh), 113,7 (2C, C_{ArPMB}), 105,0 (C-1A), 100,1 (C-1D), 99,2 (C-1C), 94,3 (C-1B), 92,3 (CCl₃), 67,5 (C_{CO2Bn}), 55,2 (CH₃PMB), 38,1 (COCH₂lev), 29,8 (CH₃lev), 28,2 (CO₂CH₂lev).

- 55 Alil (4-O-bencil-3-O-para-metoxibencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-O-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(2,3-di-O-bencil-β-D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1→3)-4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosido (280).

AcOH (20 mL), seguido por monohidrato de hidracina (443 µL, 9,12 mmoles), se añadieron en gotas a una solución de 279 (3,23 g, 1,82 mmoles) en piridina anhidra (30 ml) agitada a 0°C en atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se

agitó durante 1 h permitiendo que el baño de enfriamiento alcanzara la ta. Después de la adición de DCM y agua, se separaron las dos fases y la ac. se volvió a extraer dos veces con DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron por filtración a través de un filtro separador de fases y los compuestos volátiles se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Chex/EtOAc 75:25 a 65:35) para dar el alcohol 280 (2,87 g, 94%) como una espuma blanca.

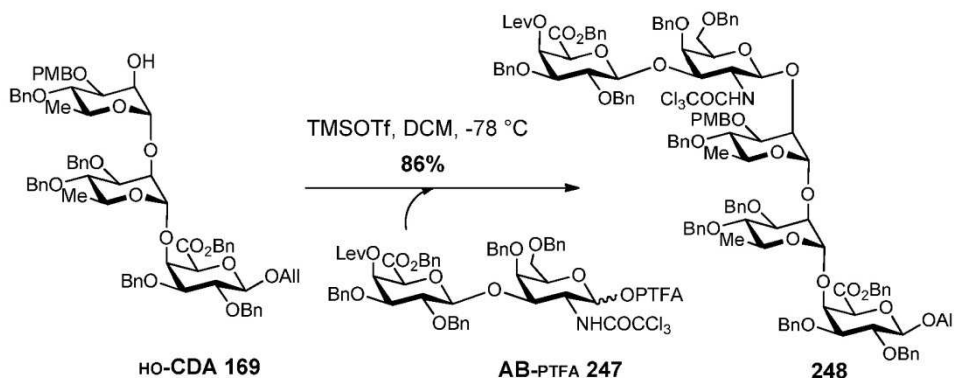
^1H RMN (CDCl_3), δ 7,42-7,10 (m, 42H, H_{Ar}), 6,91-6,87 (m, 2H, $J = 8,6$ Hz, H_{ArPMB}), 6,86 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 6,8$ Hz, NH), 5,88 (m, 1H, $\text{CH}=\text{AlI}$), 5,31 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,6$ Hz, H-1_D), 5,26 (d_{po}, 1H, $J = 12,1$ Hz, HCO_2Bn), 5,25 (m_{po}, 1H, $J_{\text{trans}} = 17,2$ Hz, $J_{\text{gem}} = 1,5$ Hz, $=\text{CH}_2\text{AlI}$), 5,17 (m, 1H, $J_{\text{cis}} = 10,4$ Hz, $=\text{CH}_2\text{AlI}$), 5,13 (d, 1H, HCO_2Bn), 5,03 (d, 1H, $J_{1,2} = 8,5$ Hz, H-1_B), 4,97 (d_{po}, 1H, $J = 11,6$ Hz, H_{Bn}), 4,96 (bs_o, 1H, H-1_C), 4,90 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz, H_{Bn}), 4,82 (d, 1H, $J = 11,0$ Hz, H_{Bn}), 4,79 (d_{po}, 1H, $J = 12,4$ Hz, H_{Bn}), 4,77 (bs_o, 2H, H_{Bn}), 4,68-4,61 (m, 6H, 5 H_{Bn} , H-3_B), 4,58 (d, 1H, $J = 11,7$ Hz, H_{Bn}), 4,49 (d, 1H, $J_{1,2} = 7,6$ Hz, H-1_A), 4,47 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, H_{Bn}), 4,43 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, H_{Bn}), 4,40 (bd, 1H, H-4_A), 4,36 (m, 1H, H_{AlI}), 4,25 (d, 1H, $J_{3,4} = 3,0$ Hz, H-4_B), 4,22 (d, 1H, $J = 11,4$ Hz, H_{Bn}), 4,14 (d, 1H, $J = 11,4$ Hz, H_{Bn}), 4,12-4,04 (m, 3H, H_{AlI} , H-2_C, H-2_D), 4,04 (d, 1H, $J_{4,5} = 0,6$ Hz, H-5_A), 3,87 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,2$ Hz, $J_{3,4} = 9,1$ Hz, H-3_C), 3,83 (dq, 1H, $J_{4,5} = 9,4$ Hz, H-5_C), 3,78 (s, 3H, CH_3PMB), 3,73-3,63 (m, 5H, H-5_D, H-3_D, H-2_B, H-2_A, H-5_B), 3,61 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 6,6$ Hz, $J_{6a,6b} = 10,0$ Hz, H-6_{aB}), 3,47 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 9,7$ Hz, $J_{3,4} = 2,7$ Hz, H-3_A), 3,45 (pt_{po}, 1H, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, $J_{4,5} = 9,4$ Hz, H-4_C), 3,39 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 5,5$ Hz, H-6_{bB}), 3,37 (pt, 1H, H-4_D), 2,39 (bs, 1H, OH-2_C), 1,32 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6_D), 1,22 (d, 1H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6_C).

^{13}C RMN (CDCl_3) parcial, δ 167,0 (C-6_A), 162,1 (NHCO), 159,4 ($\text{C}_{\text{IVArPMB}}$), 113,9 (2C, C_{ArPMB}), 103,9 (C-1_A), 100,7 (C-1_C), 100,2 (C-1_D), 97,5 (C-1_B), 92,3 (CCl_3), 67,4 ($\text{C}_{\text{CO}_2\text{Bn}}$), 55,2 (CH_3PMB). HRMS (ESI⁺): *m/z* 1694,5691 (calculado para $\text{C}_{93}\text{H}_{100}\text{Cl}_3\text{NO}_2\cdot\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: *m/z* 1694,5751).

Síntesis convergente de precursores totalmente protegidos a fragmentos de O-antígeno de SF6, SF6a y/o *E. coli* 0147 usando los bloques de construcción que se muestran en la Tabla 1.

Ejemplos seleccionados:

Pentasacárido protegido ABCDA (248). Aprovechando el diseño de bloques de construcción adecuados, el 248 totalmente protegido se obtiene en un solo paso con alto rendimiento, tras la glucosilación del aceptor 169 con donante (Esquema 8).



Esquema 8

Bencil (2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-(4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosid)uronato de alilo (248).

Una mezcla de aceptor de trisacáridos 169 (2,15 g, 1,81 mmoles), donante de disacáridos 247 (2,65 g, 2,17 mmoles) y MS en polvo 4Å recién activado (5,4 g) en DCM anhidro (36,2 ml) se agitó durante 1 h a ta en atmósfera de Ar, luego a -78°C . Se añadió TMSOTf (16,4 μL , 91 μmoles) y la mezcla de reacción se agitó a esa temperatura durante 20 min. La reacción se inactivó con Et_3N . La suspensión se filtró y el filtrado se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 95:5 a 85:5) para dar el pentasacárido 248 (3,47 g, 86%) como una espuma blanca.

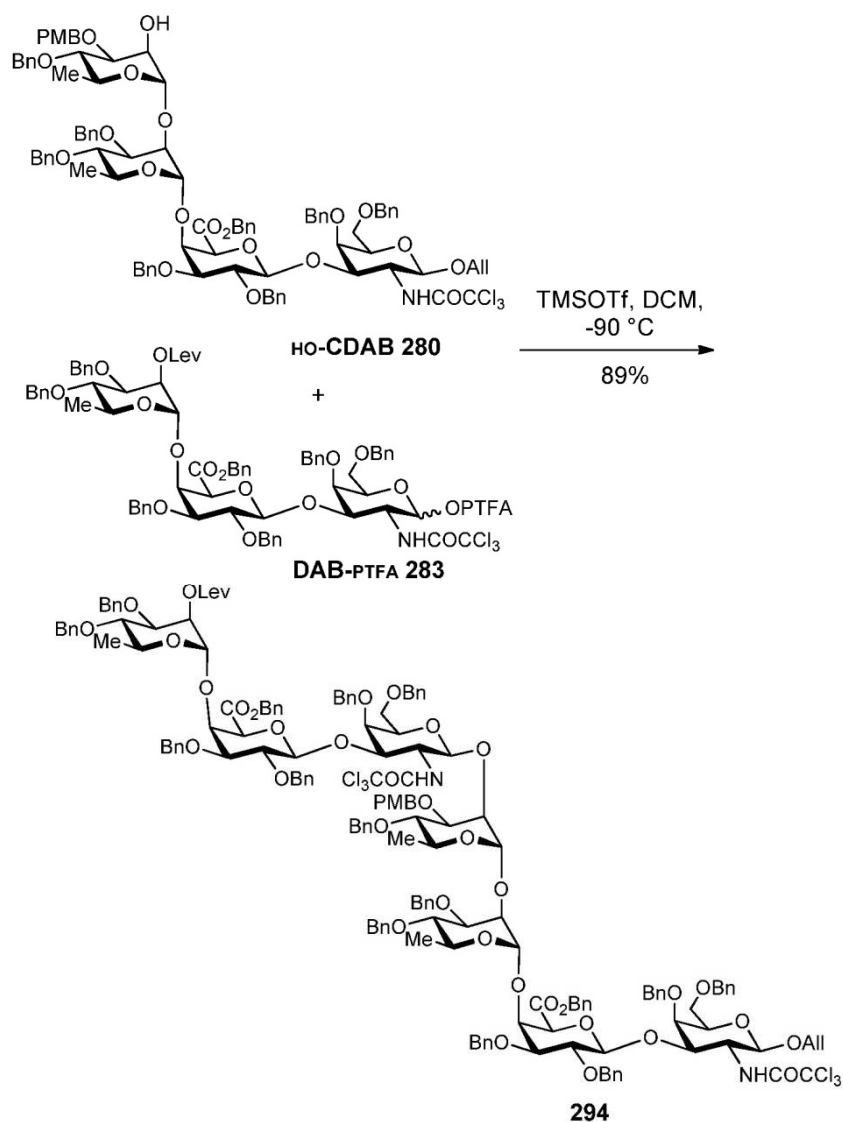
^1H RMN (CDCl_3), δ 7,47-7,43 (m, 2H, H_{Ar}), 7,41-7,02 (m, 53H, H_{Ar}), 7,16 (m, 1H, H_{Ar}), 7,08 (m, 1H, H_{Ar}), 7,03 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 6,8$ Hz, NH), 6,82 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H_{ArPMB}), 5,98 (m, 1H, $\text{CH}=\text{AlI}$), 5,82 (bd, 1H, H-4_A), 5,35 (m, 1H, $J_{\text{trans}} = 17,2$ Hz, $J_{\text{gem}} = 1,6$ Hz, $=\text{CH}_2\text{AlI}$), 5,27 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,4$ Hz, H-1_D), 5,27-5,19 (m, 4H, H-1_B, $=\text{CH}_2\text{AlI}$, 2 HCO_2Bn), 5,18 (d_{po}, 1H, $J = 11,9$ Hz, HCO_2Bn), 5,10 (d_{po}, 1H, $J = 12,1$ Hz, HCO_2Bn), 5,08 (d, 1H, $J = 11,4$ Hz, H_{Bn}), 5,00 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,2$ Hz, H-1_C), 4,92 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz, H_{Bn}), 4,91 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz, H_{Bn}), 4,87 (d, 1H, $J = 11,7$ Hz, H_{Bn}), 4,82 (d, 1H, $J = 11,1$ Hz, H_{Bn}), 4,80-4,69 (m, 6H, 5 H_{Bn} , H-3_B), 4,66-4,59 (m, 4H, H-1_A, 3 H_{Bn}), 4,57-4,46 (m, 6H, 5 H_{Bn} , H_{AlI}), 4,38-4,33

(m, 3H, H-1_A, H-4_A, H-4_B), 4,28 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, H_{Bn}), 4,22 (d, 1H, $J_{4,5} = 1,0$ Hz, H-5_A), 4,19 (d_{po}, 1H, $J = 11,7$ Hz, H_{Bn}), 4,15 (m_o, 1H, H_{All}), 4,08 (pt, 1H, H-2_C), 4,01 (pt, 1H, H-2_D), 3,99 (s, 1H, H-5_A), 3,86 (dd_{po}, 1H, $J_{2,3} = 2,9$ Hz, H-3_C), 3,85-3,78 (m, 2H, H-2_B, H-3_D), 3,78 (dq_{po}, 1H, $J_{4,5} = 9,5$ Hz, H-5_C), 3,71-3,61 (m, 6H, H-5_D, CH₃_{PMB}, H-2_A, H-5_B), 3,59-3,52 (m, 3H, H-6_{AB}, H-2_{A'}, H-3_{A'}), 3,49 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9,8$ Hz, $J_{3,4} = 2,8$ Hz, H-3_A), 3,43 (pt, 1H, $J_{3,4} = 9,5$ Hz, H-4_C), 3,38 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 5,2$ Hz, $J_{6a,6b} = 9,0$ Hz, H-6_B), 3,32 (pt, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,4$ Hz, H-4_D), 2,59-2,41 (m, 4H, CH₂_{lev}), 2,00 (s, 3H, CH₃_{lev}), 1,28 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6_D), 1,20 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6_C).

¹³C RMN (CDCl₃), δ 205,9 (CO_{lev}), 171,3 (CO₂_{lev}), 167,3, 166,2 (2C, C-6_A, C-6_{A'}), 161,7 (NHCO), 113,7 (2C, C_{Ar}_{PMB}), 103,6 (C-1_{A'}, $^1J_{CH} = 163,2$ Hz), 102,6 (C-1_A, $^1J_{CH} = 155,6$ Hz), 101,2 (C-1_D, $^1J_{CH} = 176,2$ Hz), 100,2 (C-1_C, $^1J_{CH} = 173,5$ Hz), 98,9 (C-1_B, $^1J_{CH} = 162,4$ Hz), 92,6 (CCl₃), 67,5, 67,3 (2C, C_{CO2}_{Bn}), 55,1 (CH₃_{PMB}), 37,9 (COCH₂_{lev}), 29,5 (CH₃_{lev}), 28,0 (CO₂CH₂_{lev}).

HRMS (ESI⁺): m/z 2238,8015 (calculado para C₁₂₅H₁₃₂Cl₃NO₂₉Na [M+Na]⁺: m/z 2238,7849).

Heptasacárido protegido DABCDAB (294). Aprovechando el diseño de bloques de construcción adecuados, el 294 totalmente protegido se obtiene en un solo paso con alto rendimiento, tras la glucosilación del aceptor de tetrasacárido 280 con el donante de trisacáridos 283 (Esquema 9).



Esquema 9

Alil (3,4-di-*O*-bencil-2-*O*-levulinil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencil)-(1 \rightarrow 3)-(4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil-

α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-O-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-O-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosido (294).

Una mezcla de aceptor de tetrasacárido 280 (0,50 g, 0,30 mmoles), donante de trisacáridos 283 (0,65 g, 0,42 mmoles) y MS en polvo 4Å (1,25 g) en DCM anhidro (7,5 ml) se agitó a ta en atmósfera de Ar durante 1 h. La suspensión se enfrió a -90°C y se añadió TMSOTf (2,7 μ l, 15 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min permitiendo que el baño de enfriamiento alcanzara -78°C y se añadió Et₃N para inactivar la reacción. La suspensión se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 88:12 a 8:2) para dar el heptasacárido 294 (0,81 g, 89%) como una espuma blanca.

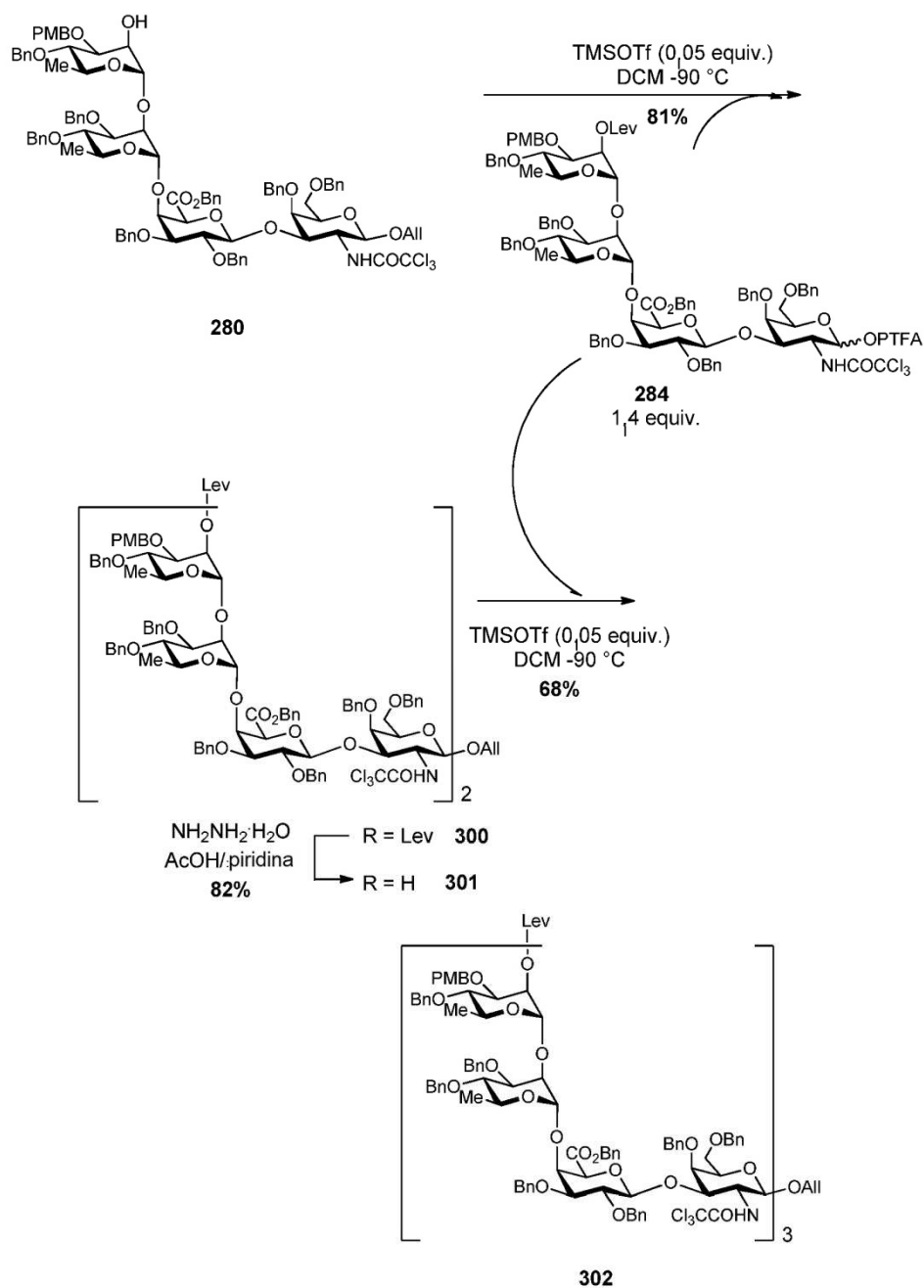
¹H RMN (CDCl₃), δ 7,41-6,95 (m, 78H, 77H_{Ar}, NH-2B'), 6,82 (d, 1H, $J_{NH,2} = 6,7$ Hz, NH-2B'), 6,81-6,78 (m, 2H, H_{ArPMB}), 5,87 (m, 1H, CH=All), 5,42 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1,9$ Hz, $J_{2,3} = 3,0$ Hz, H-2D'), 5,29-5,20 (m, 5H, H-1D, =CH₂All, 2HCO₂Bn, H-1B'), 5,16 (m, 1H, $J_{cis} = 10,4$ Hz, $J_{gem} = 1,5$ Hz, =CH₂All), 5,14 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,7$ Hz, H-1D'), 5,11 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, HCO₂Bn), 5,10 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, HCO₂Bn), 5,02 (d_{po}, 1H, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1B), 4,01 (d_{po}, 1H, $J = 11,6$ Hz, H_{Bn}), 4,96 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,4$ Hz, H-1C), 4,93 (2d_o, 2H, H_{Bn}), 4,88 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, H_{Bn}), 4,81 (d, 1H, $J = 11,1$ Hz, H_{Bn}), 4,79 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, H_{Bn}), 4,78-4,68 (m, 7H, H-3B', 6H_{Bn}), 4,66-4,51 (m, 10H, 8H_{Bn}, H-1A', H-3B), 4,49-4,39 (m, 5H, 3H_{Bn}, H-1A, H-4A'), 4,37-4,32 (m, 2H, H_{All}, H-4A), 4,31 (bd, 1H, $J_{3,4} = 3,0$ Hz, H-4B'), 4,26 (d, 1H, $J = 10,8$ Hz, H_{Bn}), 4,21-4,16 (m, 3H, H-4B, 2H_{Bn}), 4,11-4,04 (m, 5H, H-2C, H-5A', H_{All}, 2H_{Bn}), 3,98 (bs, 1H, H-5A), 3,93 (pt, 1H, H-2D), 3,88-3,80 (m, 3H, H-3c, H-2B', H_{Bn}), 3,79-3,56 (m, 14H, H-5C, H-5D', H-2A', H-3D', H-3D, CH₃PMB, H-2B, H-6aB, H-2A, H-5B, H-5D, H-5B'), 3,49 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9,7$ Hz, $J_{3,4} = 2,8$ Hz, H-3A'), 3,49-3,40 (m, 2H, H-4C, H-3A), 3,40-3,34 (m, 2H, H-6bB, H-6aB'), 3,33-3,26 (m, 3H, H-4D, H-6bB', H-4D'), 2,70-2,60 (m, 4H, CH₂lev), 2,14 (s, 3H, CH₃lev), 1,30 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D'), 1,29 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6D), 1,20 (d, 3H, $J_{5,6} = 6,2$ Hz, H-6C).

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 206,1 (CO_{lev}), 171,4 (CO₂lev), 166,9 (2C, C-6A, C-6A'), 162,1 (NHCO-2B), 161,7 (NHCO-2B'), 159,2 (C_{IVPMB}), 130,7 (C_{IVPMB}), 113,7 (2C, C_{ArPMB}), 104,0 (C-1A'), 103,8 (C-1A), 101,0 (C-1C), 100,4 (C-1D), 99,0 (C-1D'), 98,8 (C-1B'), 97,5 (C-1B), 92,7, 92,2 (2C, CCl₃), 67,4, 67,3 (2C, CCO₂Bn), 55,1 (CH₃PMB), 38,1 (COCH₂lev), 29,8 (CH₃lev), 28,2 (CO₂CH₂lev).

HRMS (ESI⁺): m/z 1536,4961 (calculado para C₁₆₇H₁₇₆Cl₆N₂O₃₈Na₂ [M+2Na]²⁺: m/z 1536,4913).

Octasacárido protegido (CDAB)₂ (300) y dodecasacárido (CDAB)₃ (302): ejemplo de un proceso iterativo.

Como se ilustra a continuación, los bloques de construcción enumerados en la Tabla 1 están ventajosamente involucrados en un proceso iterativo para la síntesis de estructuras más grandes que dos unidades de repetición. Se requieren al menos tres pasos de glucosilación para alcanzar los correspondientes oligo- o polisacáridos. En este sentido, el tetrasacárido CDAB-PTFA (284) fue identificado como crucial en el proceso de elongación. Fue diseñado para actuar como donante y potencial aceptor, por lo que su 2c-OH está enmascarado con un grupo protector ortogonal, a saber, un éster de levulinoilo (Lev). Curiosamente, el tetrasacárido clave 284 por lo tanto, se puede usar repetidamente según un proceso iterativo de glucosilación/delevulinolación para alcanzar la longitud de oligo- o polisacárido deseada. De hecho, cuando se realiza a -90°C en condiciones controladas, la condensación del aceptor HO-CDAB (280) y del donante CDAB-PTFA (284) dio el octasacárido (CDAB)₂ totalmente protegido (300) en alto rendimiento. La hidracinólisis del éster de levulinoilo ubicado en la posición 2 del residuo final no reductor dio el aceptor de octasacárido HO-(CDAB)₂ (301), que se ajustó para reaccionar con el mismo donante CDAB-PTFA (284), de nuevo a -90°C, para dar el dodecasacárido totalmente protegido (CDAB)₃ en alto rendimiento (302). Tenga en cuenta que la temperatura de reacción es fundamental para garantizar la glucosilación requerida. El dodecasacárido 302 se obtiene así en 3 pasos de alto rendimiento mediante la combinación apropiada de dos de los ocho bloques de construcción recientemente disponibles (Esquema 10).



Esquema 10

Alil (4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil-2-*O*-levulinoil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-(4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosido (300).

Una mezcla de aceptor de tetrasacárido 280 (1,40 g, 0,84 mmoles), donante de tetrasacáridos 284 (2,23 g, 1,17 mmoles) y MS en polvo 4Å (3,5 g) en DCM anhidro (29 ml) se agitó a ta en atmósfera de Ar durante 1 h. La suspensión se enfrió a -90°C y se añadió TMSOTf (7,6 μ l, 42 μ moles). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min permitiendo que el baño de enfriamiento alcanzara -78°C y se añadió Et₃N para inactivar la reacción. La suspensión se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO₂ 20-40 μ m, Tol/EtOAc 92:8 a 8:2) para dar octasacárido 300 (2,28 g, 81%) como una espuma blanca.

¹H RMN (CDCl₃), δ 7,41-6,95 (m, 85H, 84H_{Ar}, NH-2B), 6,87-6,74 (m, 5H, 4H_{ArPMB}, NH-2B), 5,87 (m, 1H, CH=AlI), 5,46 (dd, 1H, J_{1,2} = 1,9 Hz, J_{2,3} = 3,1 Hz, H-2C), 5,28-5,20 (m, 6H, H-1D, H-1D', =CH₂AlI, 2H_{CO₂Bn}, H-1B'), 5,16 (m, 1H, J_{cis} = 10,4 Hz, J_{gem} = 1,5 Hz, =CH₂AlI), 5,16-5,08 (m, 2H, H_{CO₂Bn}), 5,04 (d, 1H, J = 12,2 Hz, H_{Bn}), 5,03 (d, 1H, J_{1,2} = 8,3 Hz, H-1B), 4,96 (d, 1H, J_{1,2} = 1,2 Hz, H-1C), 4,95-4,86 (m, 4H, H_{Bn}), 4,81 (d_{po}, 1H, J = 10,5 Hz, H_{Bn}), 4,79-4,71 (m, 7H, H-1C', 6H_{Bn}), 4,69 (dd_{po}, 1H, J_{2,3} = 10,9 Hz, J_{3,4} = 10,9 Hz, H-3B'), 4,67-4,56 (m, 10H, H-3B, 9H_{Bn}), 4,54 (d_{po}, 1H, J_{1,2} = 7,5 Hz, H-1A'), 4,53 (d, 1H, J = 11,0 Hz, H_{Bn}), 4,49-4,39 (m, 5H, 4H_{Bn}, H-1A), 4,38-4,30 (m, 4H, H-4A', H-4A, H_{AlI}, H-4B'), 4,21-4,16 (m, 3H, 2H_{Bn}, H-4B), 4,21-4,04 (m, 6H, H-2C, H_{AlI}, 4H_{Bn}), 4,04 (bs, 1H, H-5A'), 3,98 (bs, 1H, H-5A), 3,96-3,93 (m, 2H, H-2D, H-2D'), 3,91 (ddpo, 1H, J_{2,3} = 3,2 Hz, J_{3,4} = 9,4 Hz, H-3C'), 3,86-3,74 (m, 7H, H-3C, H-2B', H-5C, H-5C', CH₃PMB), 3,70-3,56 (m, 13H, H-5D', H-2A', H-3D', H-3D, CH₃PMB, H-2B, H-6aB, H-2A, H-5B, H-5D, H-5B'), 3,46-3,25 (m, 9H, H-3A', H-4C, H-3A, H-4C', H-6bB, H-6aB', H-4D, H-6bB', H-4D'), 2,76-2,66 (m, 4H, CH₂lev), 2,18 (s, 3H, CH₃lev), 1,29 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D'), 1,28 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D), 1,20 (2d_o, 6H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6C, H-6C').

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 206,1 (CO_{lev}), 171,6 (CO₂lev), 166,9 (2C, C-6A, C-6A'), 162,1 (NHCO-2B), 161,7 (NHCO-2B'), 159,2 (2C, C_{IVPMB}), 130,6, 130,3 (2C, C_{IVPMB}), 113,7 (4C, C_{ArPMB}), 103,9 (C-1A'), 103,8 (C-1A), 101,0 (C-1C), 100,4 (C-1D), 100,1 (C-1D'), 99,2 (C-1C'), 98,8 (C-1B'), 97,5 (C-1B), 92,7, 92,2 (2C, CCl₃), 67,3 (2C, C_{CO₂Bn}), 55,2, 55,1 (2C, CH₃PMB), 38,1 (COCH₂lev), 29,8 (CH₃lev), 28,2 (CO₂CH₂lev).

HRMS (ESI⁺): m/z 1714,5948 (calculado para C₁₈₈H₂₀₀Cl₆N₂O₄₃Na₂ [M+2Na]²⁺: m/z 1714,5725).

Alil (4-O-bencil-3-O-para-metoxibencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-O-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(2,3-di-O-bencil-β-D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1→3)-(4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosil)-(1→2)-(4-O-bencil-3-O-para-metoxibencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-O-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(2,3-di-O-bencil-β-D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1→3)-4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosido (301).

A una solución de 300 totalmente protegido (1,31 g, 0,39 mmoles) en piridina anhidra (9,6 ml) agitada a 0°C en atmósfera de Ar se añadió gota a gota AcOH (6,4 ml) seguido de monohidrato de hidracina (94 μl, 1,93 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h permitiendo que el baño de enfriamiento alcanzara la ta. Después de la adición de DCM y agua, se separaron las dos fases y la ac. se volvió a extraer dos veces con DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron pasándolos a través de un filtro separador de fases y los compuestos volátiles se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Tol/EtOAc 9:1 a 75:25) para dar alcohol 301 (1,05 mg, 82%) como una espuma blanca.

¹H RMN (CDCl₃), δ 7,41-6,94 (m, 85H, 84H_{Ar}, NH-2B), 6,90-6,86 (m, 2H, H_{ArPMB}), 6,84 (d, 1H, J_{NH,2} = 6,7 Hz, NH-2B), 6,82-6,78 (m, 2H, H_{ArPMB}), 5,87 (m, 1H, CH=AlI), 5,29-5,20 (m, 6H, H-1D, H-1D', =CH₂AlI, 2H_{CO₂Bn}, H-1B'), 5,16 (m, 1H, J_{cis} = 10,4 Hz, J_{gem} = 1,5 Hz, =CH₂AlI), 5,16-5,09 (m, 2H, H_{CO₂Bn}), 5,04 (d, 1H, J = 11,4 Hz, H_{Bn}), 5,03 (d, 1H, J_{1,2} = 8,3 Hz, H-1B), 4,96 (d, 1H, J_{1,2} = 1,4 Hz, H-1C), 4,95-4,86 (m, 5H, H-1C', H_{Bn}), 4,83-4,68 (m, 8H, 7H_{Bn}, H-3B'), 4,68-4,51 (m, 13H, 11H_{Bn}, H-3B, H-1A'), 4,49-4,40 (m, 4H, 3H_{Bn}, H-1A), 4,39-4,31 (m, 4H, H-4A', H-4A, H_{AlI}, H-4B'), 4,22-4,16 (m, 3H, 2H_{Bn}, H-4B), 5,14 (d, 1H, J = 11,2 Hz, H_{Bn}), 4,12-4,04 (m, 7H, H-2C, H_{AlI}, 3H_{Bn}, H-2C' H-5A'), 4,00 (pt_{po}, 1H, H-2D'), 3,99 (s_o, 1H, H-5A), 3,94 (pt, 1H, H-2D), 3,88-3,74 (m, 8H, H-3C', H-3C, H-2B', H-5C, H-5C', CH₃PMB), 3,72-3,56 (m, 13H, H-5D', H-2A', H-3D', H-3D, CH₃PMB, H-2B, H-6aB, H-2A, H-5B, H-5D, H-5B'), 3,48-3,26 (m, 9H, H-3A', H-4C, H-3A, H-4C', H-6bB, H-6aB', H-4D, H-6bB', H-4D'), 2,37 (bs, 1H, OH-2C), 1,30 (d_{po}, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D'), 1,29 (d_{po}, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6D'), 1,21 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6C'), 1,20 (d, 3H, J_{5,6} = 6,2 Hz, H-6C').

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 166,9 (2C, C-6A, C-6A'), 162,1 (NHCO-2B), 161,7 (NHCO-2B'), 159,4, 159,2 (2C, C_{IVPMB}), 130,7, 130,2 (2C, C_{IVPMB}), 113,9, 113,7 (4C, C_{ArPMB}), 104,0 (C-1A'), 103,8 (C-1A), 101,0 (C-1C), 100,7 (C-1C'), 100,4 (C-1D), 100,3 (C-1D'), 98,8 (C-1B'), 97,4 (C-1B), 92,7, 92,2 (2C, CCl₃), 67,3 (2C, C_{CO₂Bn}), 55,2, 55,1 (2C, CH₃PMB).

HRMS (ESI⁺): m/z 1665,5668 (calculado para C₁₈₃H₁₉₄Cl₆N₂O₄₁Na₂ [M+2Na]²⁺: m/z 1665,5542).

Alil (4-O-bencil-3-O-para-metoxibencil-2-O-levulinoil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-O-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(2,3-di-O-bencil-β-D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1→3)-(4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosil)-(1→2)-(4-O-bencil-3-O-para-metoxibencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-O-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(2,3-di-O-bencil-β-D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1→3)-(4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosil)-(1→2)-(4-O-bencil-3-O-para-metoxibencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→2)-(3,4-di-O-bencil-α-L-ramnopiranosil)-(1→4)-(2,3-di-O-bencil-β-D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1→3)-4,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-galactopiranosido (302).

Una mezcla de aceptor de octasacáridos 301 (153 g, 46 μmoles), donante de tetrasacárido 284 (121 mg, 64 μmoles), y MS en polvo 4Å (375 mg) en DCM anhidro (1,6 ml) se agitó a ta en atmósfera de Ar durante 1 h. La suspensión se enfrió a -90°C y se añadió TMSOTf (0,4 μL, 2 μmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min permitiendo que el baño de enfriamiento alcance -78°C y se añadió Et₃N para inactivar la reacción ya que un control de TLC (Tol/acetona 9:1) mostró la presencia de un nuevo compuesto mayoritario (rf = 0,24) y que no quedó ni aceptor (rf = 0,19) ni donante (rf = 0,41). La suspensión se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO₂ 20-40 μm, Tol/EtOAc 92:8 a 8:2) para dar el dodecasacárido 302 (156 mg, 68%) como una espuma blanca.

¹H RMN (CDCl₃), δ 7,42-6,94 (m, 129H, 126 H_{Ar}, NH-2_{B'}, NH-2_{B''}, NH-2_B), 6,87-6,77 (m, 6H, H_{ArPMB}), 5,87 (m, 1H, CH=All), 5,48 (dd, 1H, J_{1,2} = 1,7 Hz, J_{2,3} = 3,1 Hz, H-2_{C'}), 5,29-5,15 (m, 10H, H-1_D, H-1_{D'}, H-1_{D''}, =CH₂All, 3H_{CO₂Bn}, H-1_{B'}, H-1_{B''}, =CH₂All), 5,13-5,07 (m, 3H, H_{CO₂Bn}), 5,05 (d, 1H, J = 11,2 Hz, H_{Bn}), 5,03 (d, 1H, J_{1,2} = 8,4 Hz, H-1_B), 5,00 (d, 1H, J = 11,3 Hz, H_{Bn}), 4,98-4,88 (m, 7H, H-1_C, H-1_{C'}, 5H_{Bn}), 4,87-4,67 (m, 14H, H-1_{C'}, H-3_{B''}, H-3_{B'}, 11H_{Bn}), 4,68-4,39 (m, 25H, H-3_B, H-1_{A'}, H-1_A, H-1_{A''}, 21H_{Bn}), 4,38-4,31 (m, 5H, H-4_{A''}, H-4_{A'}, H-4_A, H_{All}, H-4_{B''*}), 4,28 (d, 1H, J_{3,4} = 3,2 Hz, H-4_{B''*}), 4,22-4,16 (m, 4H, 3H_{Bn}, H-4_B), 4,16-3,98 (m, 13H, H-2_C, H_{All}, H-2_{C'}, H-5_{A'}, H-5_{A''}, H-5_A, 7H_{Bn}), 3,97-3,90 (m, 3H, H-2_D, 2_{D''}, H-3_{C''}), 3,89 (pt, 1H, H-2_D), 3,87-3,74 (m, 10H, H-3_{C'}, H-3_C, H-2_{B'}, H-2_{B''}, H-5_C, H-5_{C'}, H-5_{C''}, CH₃PMB), 3,71-3,55 (m, 20H, H-5_D, H-5_{D'}, H-5_{D''}, H-2_B, H-5_B, H-5_{B'}, H-5_{B''}, H-2_A, H-2_{A'}, H-2_{A''}, H-3_{D'}, H-3_D, H-3_{D''}, 2CH₃PMB, H-6_{aB}), 3,47-3,24 (m, 14H, H-3_{A'}, H-3_{A''}, H-4_C, H-3_A, H-4_{C'}, H-4_{C''}, H-6_{bB}, H-6_{aB'}, H-6_{aB''}, H-4_D, H-6_{bB'}, H-6_{bB''}, H-4_{D'}, H-4_{D''}), 2,77-2,67 (m, 4H, CH₂lev), 2,12 (s, 3H, CH₃lev), 1,32-1,29 (m, 9H, H-6_D, H-6_{D'}, H-6_{D''}), 1,23-1,19 (m, 9H, H-6_C, H-6_{C'}, H-6_{C''}).

¹³C RMN (CDCl₃) parcial, δ 206,2 (CO_{lev}), 171,7 (CO₂lev), 166,9 (3C, C-6_A, C-6_{A'}, C-6_{A''}), 162,1 (NHCO-2_B), 161,7 (2C, NHCO-2_{B'}, NHCO-2_{B''}), 159,2, 159,1 (3C, C_IPMB), 130,7, 130,2 (3C, C_IPMB), 113,9, 113,7 (6C, C_{Ar}PMB), 103,9-103,8 (3C, C-1_A, C-1_{A'}, C-1_{A''}), 101,0 (2C, C-1_C, C-1_{C'}), 100,4, 100,2 (3C, C-1_D, C-1_{D'}, C-1_{D''}), 99,2 (C-1_{C'}), 98,8 (C-1_{B'}, C-1_{B''}), 97,4 (C-1_B), 92,6, 92,2 (3C, CCl₃), 67,4-67,3 (3C, C_{CO₂Bn}), 55,2, 55,1 (3C, CH₃PMB), 38,2 (COCH₂lev), 29,9 (CH₃lev), 28,2 (CO₂CH₂lev).

II. Antigenicidad de los oligo- y/o polisacáridos de la invención

A. Materiales y Métodos

1) Producción y caracterización de mAbs específicos para *S. flexneri* serotipo 6 LPS

Los ratones se inmunizaron con bacterias muertas por calor preparadas con la cepa *Shigella flexneri* serotipo 6 (SF6) denominada Sc544. Brevemente, los ratones se inmunizaron primero por vía intraperitoneal (i.p.) con 10⁸ bacterias muertas por calor mezcladas con adyuvante incompleto de Freund, luego dos veces i.p. con 10⁸ bacterias muertas por calor sin adyuvante en un intervalo de un mes. La inmunogenicidad se midió por ELISA (como se describe para la identificación de la concentración apropiada de IgG para usar en la medición de IC50) contra SF6 LPS purificado de la cepa SF6 Sc544 según Westphal O y Jann K (Methods Carbohydr. Chem. 5 83 (1965)). Los ratones que mostraban una respuesta de anticuerpos anti-LPS SF6 se sometieron luego a una inyección de refuerzo intravenosa (i.v.) 3 días antes de ser sacrificados para la recuperación del bazo para realizar la fusión celular para la obtención de hibridoma, como se describe en Phalipon A. et al (J. Immunol. 176 1686 (2006)).

Los hibridomas se seleccionaron del sobrenadante del cultivo celular procedente de la fusión por ELISA frente a SF6 LPS purificado. Se usaron hibridomas positivos para la producción de una gran cantidad del mAb correspondiente, que se purificó por cromatografía de proteína G. Así, el hibridoma A22-4' secretor del anticuerpo monoclonal mIgG A22-4' fue depositado en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM, París, Francia) según el Tratado de Budapest con el número 1-4813, el 28 de octubre de 2013.

2) ELISA para mediciones de IC50

La unión de la mIgG A22-4' disponible a los oligosacáridos sintéticos se midió como se describió previamente (Phalipon A. et al (J. Immunol. 176 1686 (2006))). Brevemente, la concentración de mIgG a utilizar se definió en el primer paso. Para ello se estableció una curva estándar para mIgG A22-4'. La mIgG se incubó a diferentes concentraciones, durante la noche a 4°C, en placas de microtitulación recubiertas con SF6 LPS purificado de la cepa SF6 Sc544 a una concentración de 2,5 µg/mL en tampón carbonato (pH 9,6), luego con PBS-BSA al 1% durante 30 min a 4°C. Después de lavar con PBS-Tween 20 (0,05%), se añadió IgG anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina a una dilución de 1/5.000 (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37°C. Después de lavar con PBS-Tween 20 (0,05%), se añadió el sustrato (12 mg de fosfato de p-nitrofenilo en 1,2 mL de tampón Tris-HCl 1 M (pH 8,8) y 10,8 mL de NaCl 5 M). Una vez que se desarrolló el color, la placa se leyó en un lector de microplacas Dynatech MR400 de 405 nm). Se ajustó una curva estándar OD = f([Ab]) a la ecuación cuadrática Y = aX² + bX + c, donde Y es la OD y X es la concentración de Ab. Un factor de correlación (r²) de 0,99 se obtuvo de forma rutinaria. La concentración de mIgG A22-4' a usar en el segundo paso para medir la IC50, que se define como la concentración de oligosacáridos necesaria para inhibir el 50% de la unión de mIgG a LPS, se eligió como sigue. Corresponde a la concentración mínima de mAb que da la OD máxima en la curva estándar.

Luego, para la medición de la IC50, la mIgG A22-4', utilizada a la concentración de 0,025 µg/ml, se incubó durante la noche a 4°C con diferentes concentraciones de los oligosacáridos a ensayar en PBS-BSA al 1%. La concentración máxima ensayada fue de 2,5 mM para todos los oligosacáridos. Luego, se realizó la medición de mIgG no unida como se describió anteriormente usando placas de microtitulación recubiertas con SF6 LPS purificado. La concentración de mAb se dedujo de la curva estándar. Se definió una concentración de mIgG libre del 100% para el mAb incubado en las mismas condiciones pero sin ningún oligosacárido. Finalmente, una curva correspondiente al % de mIgG no unido = f([oligosacárido]) permite calcular la IC50 para cada oligosacárido ensayado.

B. Resultados

La unión de mIgG A22-4' a los sintéticos u oligo- o polisacáridos se evaluó en ELISA de inhibición (Tabla B)

Oligosacáridos sintéticos probados como glicósido de propilo	IC ₅₀ (mM) [#]
CDAB	0,016
AcCDAB	0,036
AcCDABAcC	≤ 0,5
CDABCDAB	0,015
CDABCDAB	0,004
BCDAB	0,025
BCDABC	≤ 0,5
BCDABCDAB	0,018
DABCDAB	0,053
ABCDAB	0,019

« ≤ » corresponde a valores inferiores pero cercanos al valor mencionado.

Referencias

- [1] K. Hygge Blakeman, A. Weintraub, G. Widmalm, *Eur. J. Biochem.* 1998, 251, 534-537.
- [2] M. M. Levine, *Vaccine* 2006, 24, 3865-3873.
- [3] S. K. Niyogi, *J. Microbiol.* 2005, 43, 133-143.
- [4] L. von Seidlein, D. R. Kim, M. Ali, H. Lee, X. Wang, V. D. Thiem, G. Canh do, W. Chaicumpa, M. D. Agtini, A. Hossain, Z. A. Bhutta, C. Mason, O. Sethabutr, K. Talukder, G. B. Nair, J. L. Deen, K. Kotloff, J. Clemens, *PLoS Med.* 2006, 3, e353.
- [5] a) M. M. Levine, K. L. Kotloff, E. M. Barry, M. F. Pasetti, M. B. Sztein, *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, 5, 540-553; b) M. N. Kweon, *Curr. Opin Infect. Dis.* 2008, 21, 313-318.
- [6] K. L. Kotloff, J. P. Winickoff, B. Ivanoff, J. D. Clemens, D. L. Swerdlow, P. J. Sansonetti, G. K. Adak, M. M. Levine, *Bull. World Health Organ.* 1999, 77, 651-666.
- [7] a) C. Ferreccio, V. Prado, A. Ojeda, M. Cayyazo, P. Abrego, L. Guers, M. M. Levine, *Am. J. Epidemiol.* 1991, 134, 614-627; b) J. H. Passwell, S. Ashkenzi, Y. Banet-Levi, R. Ramon-Saraf, N. Farzam, L. Lerner-Geva, H. Even-Nir, B. Yerushalmi, C. Y. Chu, J. Shiloach, J. B. Robbins, R. Schneerson, I. S. S. Grp, *Vaccine* 2010, 28, 2231-2235.
- [8] F. R. Noriega, F. M. Liao, D. R. Maneval, S. Ren, S. B. Formal, M. M. Levine, *Infect. Immun.* 1999, 67, 782-788.
- [9] a) D. A. Simmons, E. Romanowska, *J. Med. Microbiol.* 1987, 23, 289-302; b) A. V. Perepelov, M. E. Shekht, B. Liu, S. D. Shevelev, V. A. Ledov, S. N. Senchenkova, V. L. L'vov, A. S. Shashkov, L. Feng, P. G. Aparin, L. Wang, Y. A. Knirel, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012, DOI: 10.1111/j.1574-1695X.2012.01000.x.
- [10] H. L. DuPont, R. B. Hornick, M. J. Snyder, J. P. Libonati, S. B. Formal, E. J. Gangarosa, *J. Infect. Dis.* 1972, 125, 12-16.
- [11] a) A. Phalipon, M. Tanguy, C. Grandjean, C. Guerreiro, F. Belot, D. Cohen, P. J. Sansonetti, L. A. Mulard, *J. Immunol.* 2009, 182, 2241-2247; b) M. Wacker, C. Waechter, en el documento WO 2011/062625 A1, vol. WO 2011/062625 A1 (Ed.: Glycovaxyn), CH, 2011, pp. 1-156.
- [12] R. W. Kaminski, E. V. Oaks, *Expert Rev. Vaccines* 2009, 8, 1693-1704.
- [13] a) P. Costantino, R. Rappuoli, F. Berti, *Expert Opin Drug Discov* 2011, 6, 1045-1066;
- b) E. Jessouroun, I. A. Freitas Brasileiro Da Silveira, C. Chagas Bastos, C. E. Frasch, C. H. Lee, en el documento US 2007/0110762 A1, vol. US 2007/0110762 A1, EE. UU., 2007, págs. 1-18;
- c) P. J. Kniskern, S. Marburg, en *Development and clinical uses of Haemophilus influenza b conjugate vaccines* (Eds.: R. W. Ellis, D. M. Granoff), Marcel Dekker, Nueva York, 1994, págs. 37-69.

- [14] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, 2^a edición, Academic Press Inc., San Diego, 2008.
- [15] A. Fattom, R. Schneerson, D. C. Watson, W. W. Karakawa, D. Fitzgerald, I. Pastan, X. Li, J. Shiloach, D. A. Bryla, J. B. Robbins, *Infect Immun* 1993, 61, 1023-1032.
- [16] a) G. S. Bixler, Jr., R. Eby, K. M. Dermody, R. M. Woods, R. C. Seid, S. Pillai, *Adv Exp Med Biol* 1989, 251, 175-180; b) P. Costantino, S. Viti, A. Podda, M. A. Velmonte, L. Nencioni, R. Rappuoli, *Vaccine* 1992, 10, 691-698.
- [17] J. Kim, F. J. Michon, en el documento WO 2005/000346 A1, *vol.* WO 2005/000346 A1, EE.UU, 2005.
- [18] J. H. Passwell, S. Ashkenazi, E. Harlev, D. Miron, R. Ramon, N. Farzam, L. Lerner-Geva, Y. Levi, C. Chu, J. Shiloach, J. B. Robbins, R. Schneerson, *Pediatr Infect Dis J* 2003, 22, 701-706.
- [19] P. R. Paradiso, D. A. Hogerman, D. V. Madore, H. Keyserling, J. King, K. S. Reisinger, M. M. Blatter, E. Rothstein, H. H. Bernstein, J. Hackell, *Pediatrics* 1993, 92, 827-832.
- [20] D. Valmori, A. Pessi, E. Bianchi, G. Corradin, *J Immunol* 1992, 149, 717-721.
- [21] J. Alexander, J. Sidney, S. Southwood, J. Ruppert, C. Oseroff, A. Maewal, K. Snoke, H. M. Serra, R. T. Kubo, A. Sette, et al., *Immunity* 1994, 1, 751-761.
- [22] S. Kaeothip, P. Pornsuriyasak, N. P. Rath, A. V. Demchenko, *Org Lett* 2009, 11, 799-802.
- [23] A. F. Bongat, M. N. Kamat, A. V. Demchenko, *J Org Chem* 2007, 72, 1480-1483.
- [24] a) P. J. Kocienski, *Protecting groups*, 3^a ed., Thieme, Stuttgart, 2004; b) P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's protective groups in organic synthesis*, 4^a ed., Wiley-Interscience, Hoboken, NJ; Chichester, 2007.
- [25] A. V. Demchenko, *Handbook of chemical glycosylation: advances in stereoselectivity and therapeutic relevance*, Wiley-VCH, Weinheim; Chichester, 2008.
- [26] MK Gurjar, A. S. Mainkar, *Tetrahedron* 1992, 48, 6729-6738.
- [27] S. Kramer, B. Nolting, A. J. Ott, C. Vogel, *J. Carbohydr. Chem.* 2000, 19, 891-921.
- [28] J. Boutet, L. A. Mulard, *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 5526-5542.
- [29] P. Westerduin, P. E. de Haan, M. J. Dees, J. H. van Boom, *Carbohydrate Research* 1988, 180, 195-205.
- [30] F. Belot, J. C. Jacquinet, *Carbohydr. Res.* 1996, 290, 79-86.
- [31] B. M. Pinto, D. G. Morissette, D. R. Bundle, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1987, 9-14.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un oligo- o polisacárido de la siguiente fórmula: $(X)_x\text{-}\{CDAB\}_n\text{-}(Y)_y$

en el que:

A es un residuo de ácido beta-D-galacturónico (1,3),

5 B es un residuos de N-acetil-beta-D-galactosamina (1,2),

C es independientemente, en cada aparición, un residuo de alfa-L-ramnosa (1,2), en el que como máximo una de sus posiciones 3c o 4c es OAc (es decir $O\text{-C}(=O)CH_3$), siempre que cuando C sea un residuo terminal no reductor, su posición 2c pueda estar acetilada o no.

D es un residuo de alfa-L-ramnosa (1,4),

10 x e y se seleccionan independientemente entre 0 y 1,

X e Y se seleccionan independientemente entre A, B, C, D, AB, BC, CD, DA, ABC, BCD, CDA, DAB,

y en el que n es un número entero comprendido entre 1 y 6,

siempre que x, y, y n no sean nulos simultáneamente,

estando dicho oligo- o polisacárido unido covalentemente a un vehículo.

15 2. El conjugado según la reivindicación 1, en el que el oligo- o polisacárido es susceptible de unirse por un anticuerpo anti-SF6 y/o anti-SF6a.

3. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho oligo- o polisacárido tiene la siguiente fórmula:



20 A, B, C, D y n es un número entero comprendido entre 1 y 6.

4. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la relación de 3c-OAc/4c-OAc es superior a 1.

5. El conjugado según la reivindicación 1, en el que el vehículo se selecciona entre una proteína o un péptido que comprende al menos un epítipo T colaborador.

25 6. El conjugado según la reivindicación 5, en el que el vehículo es una proteína de *Shigella* capaz de inducir una respuesta inmune protectora frente a varios serotipos de *Shigella*.

7. El conjugado según la reivindicación 4, en el que el vehículo es toxoide tetánico.

8. El conjugado según la reivindicación 1, en el que el vehículo es un liposoma.

30 9. El conjugado según la reivindicación 1, en el que el oligo- o polisacárido se une al vehículo a través de un espaciador que no contiene ningún residuo de carbohidrato.

10. El conjugado según la reivindicación 1, en el que la relación de oligo- o polisacárido a vehículo está comprendida entre 1:1 y 30:1.

11. El conjugado según la reivindicación 1, en el que el oligo- o polisacárido es $\{CDAB\}_n$, en el que A, B, C, D son como se definen en la reivindicación 1, y n está comprendido entre 1 y 6.

35 12. Una composición inmunogénica que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo fisiológicamente aceptable.

13. La composición según la reivindicación 12, que comprende además un inmunógeno que brinda protección frente a otro patógeno, como por ejemplo, *S. flexneri* serotipo 1b, 2a y 3a, miembros de otras especies de *Shigella* como *S. sonnei* y *S. dysenteriae* tipo 1, o patógenos responsables de la enfermedad diarreica en humanos.

40 14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, que está formulada para administración parenteral, oral, intranasal, intradérmica, subcutánea o transcutánea.

15. Un oligo- o polisacárido (Ia) de la siguiente fórmula:



en el que:

A, B, C, D, X, Y, x e y son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,

n es un número entero comprendido entre 0 y 10,

O es el átomo de oxígeno de C₁ del residuo final reductor del oligo- o polisacárido,

5 Q es H, o un grupo LZ,

L es una cadena alquílica o alquénica C₁-C₁₂ divalente opcionalmente interrumpida por uno o más heteroátomos, en particular seleccionados entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un átomo de nitrógeno, estando opcionalmente oxidados dichos átomos de nitrógeno y azufre, y estando el átomo de nitrógeno opcionalmente implicado en un enlace acetamida, y

10 Z es una función reactiva terminal, opcionalmente protegida, capaz de formar un enlace covalente con un portador y/o un soporte sólido.

16. El oligo- o polisacárido según la reivindicación 15, en el que Z es Hal, biotina, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, azido, alcoxi, epóxido, acetal, C(=O)H, SR₁, NH₂ o NHC(=O)CH₂Hal,

siendo R₁ H, C(=O)CH₃ o SR₂, y

15 siendo R₂ un alquilo C₁-C₆, un arilo C₆-C₁₀, o un heteroarilo de 5 a 7 miembros, como piridilo, o cualquier grupo que permita convertir SSR₂ en SH.

17. El oligo- o polisacárido según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, que está inmovilizado sobre un soporte sólido.

20 18. Un kit para el diagnóstico de la infección por SF6, en el que dicho kit comprende un oligo- o polisacárido (Ia) según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, estando dicho oligo- o polisacárido (Ia) opcionalmente unido a una etiqueta o a un soporte sólido.

19. Un oligo- o polisacárido (Ib) de la siguiente fórmula:



en el que:

25 A es un residuo de ácido beta-D-galacturónico (1,3),

B es un residuo de N-protegido-beta-D-galactosamina (1,2), en el que dicho grupo N-protector es un grupo acetilo, o un precursor del mismo tal como un grupo N-tricloroacetilo,

C es un residuo de alfa-L-ramnosa (1,2), en el que como máximo uno de 3c o 4c es OAc,

D es un residuo de alfa-L-ramnosa (1,4),

30 x e y se seleccionan independientemente entre 0 y 1,

n es un número entero comprendido entre 0 y 10,

siempre que x, y, y n no sean nulos simultáneamente,

X e Y se seleccionan independientemente entre A, B, C, D, AB, BC, CD, DA, ABC, BCD, CDA, DAB,

en el que cada grupo OH y/o CO₂H de dichos residuos está opcionalmente protegido por un grupo protector,

35 W es ORⁱ, SRⁱⁱ o Hal, en el que dichos O, S y Hal son el heteroátomo de C₁ del residuo terminal reductor de la cadena de oligo- o polisacárido, estando S opcionalmente oxidado,

Rⁱ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo activador de hidroxilo anomérico o un grupo LZ, siendo L y Z como se definen anteriormente para la fórmula (Ia),

40 Rⁱⁱ es alquilo C₁-C₁₂, arilo C₆-C₁₀, un imidato que conduce preferiblemente a S-tiazolinilo (STaz) o S-benzoxazolilo (SBox).

20. Un oligosacárido que se selecciona del grupo que consiste en:

- Alil (4-O-bencil-3-O-*para*-metoxibencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-3,4-di-O-bencil- α -L-ramnopiranósido,

- Bencil (4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosid)uronato de alilo,
- Alil (4-*O*-bencil-3-*O*-*para*-metoxibencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosido,
- 5 - Alil (2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosido,
- Alil (2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosido,
- Alil (2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinoil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-galactopiranosido,
- 10 - (2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinoil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- α/β -D-galactopiranososa,
- 2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinoil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo-(1 \rightarrow 3)-*N*-feniltrifluoroacetimidato de 4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- α/β -D-galactopiranosilo,
- 15 - 2,3-di-*O*-bencil-4-*O*-levulinoil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo-(1 \rightarrow 3)-tricloroacetimidato de 4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- α/β -D-galactopiranosilo,
- (3,4-Di-*O*-bencil-2-*O*-levulinoil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-*N*-feniltrifluoroacetimidato de 4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- α/β -D-galactopiranosilo,
- (4-*O*-Bencilo-3-*O*-*para*-metoxibencil-2-*O*-levulinoil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-bencil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-bencil- β -D-galactopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-*N*-feniltrifluoroacetimidato de 4,6-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- α/β -D-galactopiranosilo.
- 20

21. Uso de un oligo- o polisacárido según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, como intermedio para la preparación de un oligo- o polisacárido (Ia) según la reivindicación 15, o de un conjugado según la reivindicación 1.