

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 180**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2003 E 06076853 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 1777236**

54 Título: **Sacáridos modificados con estabilidad mejorada en agua para su uso como medicamento**

30 Prioridad:

26.03.2002 GB 0207117

30.08.2002 GB 0220195

18.12.2002 GB 0229494

24.12.2002 GB 0230163

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

09.06.2017

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)

Rue de l'Institut 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

COSTANTINO, P.;

BERTI, F.;

NORELLI, F. y

BARTOLONI, A.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 616 180 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

Sacáridos modificados con estabilidad mejorada en agua para su uso como medicamento

Campo técnico

5 La presente invención está en el campo de la química de polisacáridos y se refiere a sacáridos modificados para su uso como medicamento, a procedimientos para su preparación y a derivados conjugados. En particular, la invención se refiere a sacáridos modificados que tienen una estabilidad mejorada en agua.

Antecedentes de la técnica

10 Los polisacáridos son moléculas biológicas importantes y se han utilizado ampliamente en la industria farmacéutica para la prevención y el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, se han utilizado polisacáridos capsulares durante muchos años en las vacunas contra las bacterias encapsuladas, tales como los meningococos (*Neisseria meningitidis*), los neumococos (*Streptococcus pneumoniae*) y el Hib (*Haemophilus influenzae* tipo B).

Para potenciar la inmunogenicidad de estos polisacáridos, especialmente en niños, se desarrollaron vacunas conjugadas. Éstas comprenden un polisacárido capsular conjugado con una proteína vehículo [por ejemplo, referencias 1, 2, 3]. La conjugación puede convertir antígenos T-independientes en antígenos T-dependientes.

15 Un problema con muchos tipos de polisacáridos es su mala estabilidad en agua. La estabilidad de los polisacáridos en agua depende de la naturaleza de los enlaces O-glucosídicos que unen las unidades de sacáridos. La mala estabilidad en agua es resultado de que los enlaces O-glucosídicos se hidrolizan fácilmente en presencia de ácidos o glucosidasas. El polisacárido capsular del meningococo del serogrupo A es un ejemplo de un polisacárido que tiene una mala estabilidad en agua.

20 La estabilidad de los polisacáridos es un problema particular en la fabricación de vacunas conjugadas. Con el fin de preparar un conjugado polisacárido-proteína, es necesario manipular grupos químicamente funcionales en el polisacárido de manera que el polisacárido pueda unirse a una proteína. El polisacárido puede unirse ya sea directamente a la proteína [2, 4] o puede unirse a través de un grupo de engarce. Se han propuesto muchos tipos diferentes de grupos de engarce para la unión de polisacáridos a proteínas [por ejemplo, 3, 5].

25 La exposición de un polisacárido a reactivos químicos, principalmente ácidos, puede dar como resultado la escisión no deseada de enlaces glucosídicos y la consiguiente fragmentación del polisacárido. Dicha fragmentación es altamente indeseable, provocando pérdidas en los rendimientos en la síntesis de conjugados polisacárido-proteína.

30 Los polisacáridos que son inestables de esta forma en general requieren una cuidadosa elección de los reactivos y condiciones para eludir los problemas descritos anteriormente. Sin embargo, esto limita los reactivos disponibles para la manipulación del polisacárido, limitando de este modo la gama de enlaces que pueden realizarse entre el polisacárido y la proteína vehículo. Además, la inestabilidad de estos polisacáridos significa que es difícil desarrollar procedimientos robustos, que puedan utilizarse para preparar vacunas a escala industrial. Es un objeto de la invención proporcionar formas de modificación de sacáridos capsulares de modo que no experimenten problemas de inestabilidad y mantengan la inmunogenicidad.

Divulgación de la invención

35 La invención se basa en el descubrimiento de que la modificación de grupos hidroxilo en unidades de monosacáridos de sacáridos capsulares ofrece una estabilidad mejorada. Los sacáridos modificados obtenidos por el procedimiento de la invención son más estables a la hidrólisis que sus homólogos sacáridos nativos.

Sacáridos modificados de la invención

40 La invención proporciona un sacárido capsular modificado que comprende un grupo de bloqueo en una posición de grupo hidroxilo sobre al menos una de las unidades de monosacáridos del correspondiente sacárido capsular nativo para su uso como medicamento.

45 La expresión "sacárido capsular modificado" significa un sacárido que es obtenible a partir de un sacárido capsular nativo mediante la modificación adecuada. Por tanto, la secuencia básica de unidades de repetición de monosacáridos en el sacárido capsular nativo se mantiene en los sacáridos capsulares modificados de la presente invención.

50 El término "sacárido" abarca tanto los oligosacáridos (por ejemplo, que contienen de 2 a 39 unidades de monosacáridos) como los polisacáridos (por ejemplo, que contienen 40 unidades de monosacárido o más). Como se encuentran de forma natural en las bacterias, los sacáridos capsulares nativos en general toman la forma de polisacáridos. Los polisacáridos pueden manipularse para proporcionar oligosacáridos más cortos. Los oligosacáridos pueden obtenerse por purificación y/o dimensionamiento del polisacárido nativo (por ejemplo, por hidrólisis en un ácido suave, por calentamiento, por cromatografía de dimensionamiento etc.).

Normalmente, los sacáridos modificados de la presente invención son oligosacáridos. Los oligosacáridos pueden obtenerse a partir de polisacáridos por cualquiera de los procedimientos de dimensionamiento descritos anteriormente.

5 Los sacáridos capsulares modificados de la presente invención son obtenibles a partir de sacáridos capsulares nativos. Sin embargo, la presente invención no se limita a sacáridos modificados obtenidos a partir de sacáridos capsulares nativos. Los sacáridos capsulares modificados de la presente invención pueden obtenerse por otros procedimientos, tales como la síntesis total o parcial.

10 El número de unidades de monosacáridos que tienen grupos de bloqueo puede variar en la presente invención. Por ejemplo, todas, o sustancialmente todas, las unidades de monosacáridos del sacárido capsular correspondiente pueden tener grupos de bloqueo. Como alternativa, al menos el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 % de las unidades de monosacáridos del sacárido capsular correspondiente pueden tener grupos de bloqueo. Al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 unidades de monosacáridos del sacárido capsular correspondiente pueden tener grupos de bloqueo.

15 Análogamente, el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacárido puede variar. Por ejemplo, el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacárido puede ser de 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferentemente de 1-4, más preferentemente de 1-2.

20 En una realización, la al menos una unidad de monosacárido que tiene un grupo de bloqueo es una unidad de monosacárido no terminal. La expresión "unidad de monosacárido no terminal" significa una unidad de monosacárido que no es una de las unidades de monosacáridos terminales en la cadena de oligosacárido/polisacárido.

25 La presente invención abarca sacáridos capsulares modificados en los que todas las posiciones de grupos hidroxilo de las unidades de monosacáridos terminales y no terminales tienen un grupo de bloqueo. Sin embargo, se prefiere que haya al menos un grupo amino o un grupo hidroxilo libre en el sacárido capsular modificado de la presente invención. Un grupo hidroxilo o un grupo amino libre es ventajoso porque proporciona un asa para reacciones adicionales del sacárido capsular modificado, por ejemplo, para la conjugación con una molécula vehículo. Cuando el sacárido modificado contiene un grupo hidroxilo libre, es preferentemente un grupo hidroxilo anomérico, preferentemente un grupo hidroxilo anomérico terminal. Cuando el sacárido modificado contiene un grupo amino, preferentemente deriva de un grupo hidroxilo anomérico. Los grupos amino son fácilmente accesibles a partir de grupos hidroxilo anoméricos por aminación reductora (utilizando, por ejemplo, $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$).

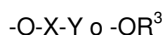
30 La expresión "grupo amino" incluye grupos de fórmula $-\text{NH}_2$ o $-\text{NH}-\text{E}$, donde E es un grupo protector de nitrógeno. A continuación se describen ejemplos de grupos protectores de nitrógeno típicos.

35 La expresión "grupo de bloqueo" significa cualquier grupo que bloquee la reactividad de un grupo hidroxilo. El experto será consciente de que existen muchos tipos diferentes de grupo de bloqueo. Los grupos de bloqueo preferidos para grupos hidroxilo son grupos que son directamente accesibles a través de una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir, mediante el reemplazo del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo por otro grupo. Los derivados adecuados de los grupos hidroxilo que actúan como grupos de bloqueo son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo, silil éteres o alquil éteres) y acetales. Algunos ejemplos específicos de dichos grupos de bloqueo son alilo, Aloc, bencilo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM y THP.

40 Sin embargo, no es necesario que el grupo de bloqueo tenga que ser accesible directamente a través de una reacción de derivatización del grupo hidroxilo. El grupo de bloqueo puede reemplazar completamente el grupo hidroxilo. Por ejemplo, el grupo de bloqueo puede ser alquilo C_{1-12} , alquilo C_{3-12} , arilo C_{5-12} , aril C_{5-12} -alquilo C_{1-6} , NR^1R^2 (donde R^1 y R^2 son como se definen a continuación), H, F, Cl, Br, CO_2H , CO_2 (alquilo C_{1-6}), CN, CF_3 , CCl_3 , etc.

45 Preferentemente, el grupo de bloqueo es un grupo aceptor de electrones. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los enlaces glucosídicos son inestables a la hidrólisis debido a la ayuda de un ataque intramolecular nucleófilo de un grupo hidroxilo del sacárido en el enlace glucosídico (es decir, por formación de un intermedio cíclico). Cuanto mayor sea la nucleofilia del grupo hidroxilo, mayor será la tendencia a un ataque nucleófilo intramolecular. Un grupo de bloqueo aceptor de electrones tiene el efecto de deslocalizar el par solitario del oxígeno, disminuyendo de este modo la nucleofilia del oxígeno y disminuyendo la tendencia al ataque nucleófilo intramolecular.

50 Preferentemente, el grupo de bloqueo es de fórmula:



en la que

X es C(O), S(O) o SO_2 ;

Y es alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ o aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquiloC₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o Y es NR¹R²;

5 R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, o R¹ y R² pueden estar unidos para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂;

R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, CO₂(alquiloC₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃, o R³ es arilo C₅₋₁₂ o aril C₅₋₁₂-alquiloC₁₋₆, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados entre F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquiloC₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃;

10 Preferentemente, cuando R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, está sustituido con 1, 2 o 3 grupos como se ha definido anteriormente.

15 Los grupos de bloqueo de fórmula -O-X-Y o -OR³ pueden prepararse a partir grupos hidroxilo por procedimientos de derivación convencionales, tales como la reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, haluro de alquilo, haluro de sulfonilo, etc. Por tanto, el átomo de oxígeno en -O-X-Y es, preferentemente, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo -X-Y en -O-X-Y reemplaza preferentemente el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

Como alternativa, los grupos de bloqueo pueden ser accesibles a través de una reacción de sustitución, tal como una sustitución de tipo Mitsunobu. Estos y otros procedimientos de preparación de grupos de bloqueo a partir de grupos hidroxilo son bien conocidos.

20 Más preferentemente, el grupo de bloqueo es -OC(O)CF₃ [6] o -OC(O)NR¹R².

Más preferentemente, el grupo de bloqueo es un grupo carbamato de fórmula -OC(O)NR¹R², en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente entre alquilo C₁₋₆. Más preferentemente, R¹ y R² son ambos metilo, es decir, el grupo de bloqueo es -OC(O)NMe₂.

25 Los grupos de bloqueo de carbamato tienen un efecto estabilizante sobre el enlace glucosídico y pueden prepararse en condiciones suaves. Un ejemplo de un procedimiento de manipulación de un sacárido para proporcionar un grupo de bloqueo carbamato se describe a continuación. Sin embargo, la invención no se limita a los sacáridos modificados preparados mediante los procedimientos ejemplificados en el presente documento y otros procedimientos para la preparación de sacáridos modificados de la invención serán fácilmente evidentes para el experto.

30 El término "alquilo" se utiliza en el presente documento para referirse a grupos alquilo tanto en forma lineal como ramificada, el grupo alquilo puede estar interrumpido con 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre -O-, -NH- o -S-. El grupo alquilo también puede estar interrumpido con 1, 2 o 3 dobles y/o triples enlaces. Sin embargo, el término "alquilo" se refiere generalmente a grupos alquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos ni interrupciones de doble o triple enlace. Cuando se hace referencia a alquilo C₁₋₁₂, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (por ejemplo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).
35 De forma similar, cuando se hace referencia a alquilo C₁₋₆, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (por ejemplo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

40 El término "cicloalquilo" incluye cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalqueno, así como combinaciones de éstos con grupos alquilo, tales como grupos cicloalquilalquilo. El grupo cicloalquilo puede estar interrumpido con 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre -O-, -NH- o -S-. Sin embargo, el término "cicloalquilo" se refiere generalmente a grupos cicloalquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen grupos ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo y adamantilo. Cuando se hace referencia a cicloalquilo C₃₋₁₂, se entiende que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

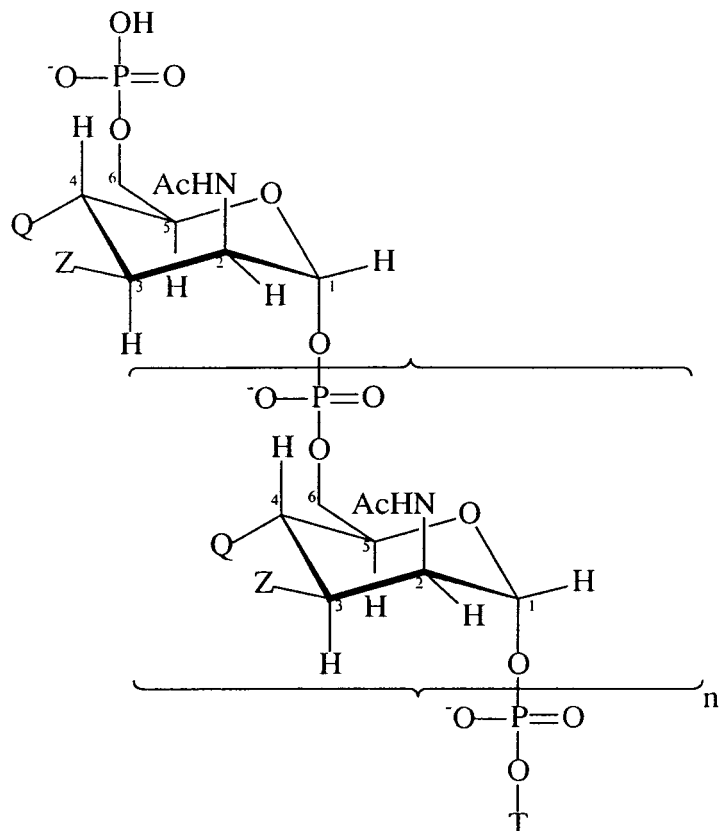
45 El término "arilo" se utiliza en el presente documento para referirse a un grupo aromático, tal como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a arilo C₅₋₁₂, se entiende que el grupo arilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 5 y 12 (por ejemplo, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

El término "aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos tales como bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

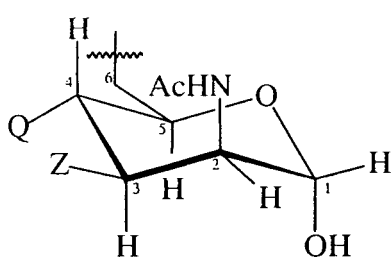
50 Cuando R¹ y R² se unen para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂, significa que R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). El grupo heterocíclico puede contener 1 o 2 heteroátomos (tales como N, O o S) distintos del átomo de nitrógeno. Son ejemplos de grupos heterocíclicos C₃₋₁₂ saturados pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidínilo y aziridinilo.

En todas las realizaciones descritas anteriormente, el sacárido capsular modificado es preferentemente un sacárido capsular modificado que tiene enlaces fosodiéster. Más preferentemente, el sacárido capsular modificado es un sacárido modificado de *Neisseria meningitidis* serogrupo A. Los sacáridos de *Neisseria meningitidis* del serogrupo A son particularmente inestables a la hidrólisis.

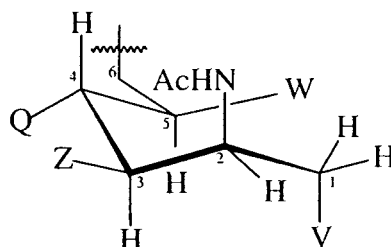
- 5 Cuando el sacárido capsular modificado es un sacárido modificado de *Neisseria meningitidis* del serogrupo A, el grupo de bloqueo está preferentemente en las posiciones 4 y/o 3, más preferentemente en la posición 4, del correspondiente sacárido de *Neisseria meningitidis* del serogrupo A. Los grupos de bloqueo en las posiciones 4 y/o 3 del sacárido de *Neisseria meningitidis* del serogrupo A han demostrado ser particularmente eficaces para mejorar la estabilidad a la hidrólisis.
- 10 La presente invención también proporciona un sacárido de fórmula:



en la que T es de fórmula (A) o (B):



(A)



(B)

- 15 n es un número entero de 1 a 100;
 cada grupo Z se selecciona independientemente entre -OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente; y
 cada grupo Q se selecciona independientemente entre -OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente;
- 20 W se selecciona entre -OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente;
 V se selecciona entre -NH₂, -NHE, -NE¹E², -OH o -O-D, donde: E, E¹ y E² son grupos protectores de nitrógeno, que pueden ser iguales o diferentes y D es un grupo protector de oxígeno.
 y en la que más de aproximadamente el 7 % (por ejemplo, el 8 %, el 9 %, el 10 % o más) de los grupos Q son

grupos de bloqueo.

Preferentemente, n es un número entero de 15 a 25.

Cada uno de los grupos n+2 Z pueden ser iguales o diferentes unos de otros. Análogamente, cada uno de los grupos n+2 Q pueden ser iguales o diferentes unos de otros.

5 V es preferentemente -NH₂ o -NHE.

10 Son grupos protectores de nitrógeno adecuados los grupos sililo (tales como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (tales como trifluoroacetamidas, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxi carbonilo, aliloxicarbonilo (Alloc), 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tales como β-trimetilsililetanosulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C₁₋₁₂, bencilo, bencidrilo, tritilo, alilo, 9-fenilfluorenilo, etc. Un grupo protector de nitrógeno preferido es Fmoc.

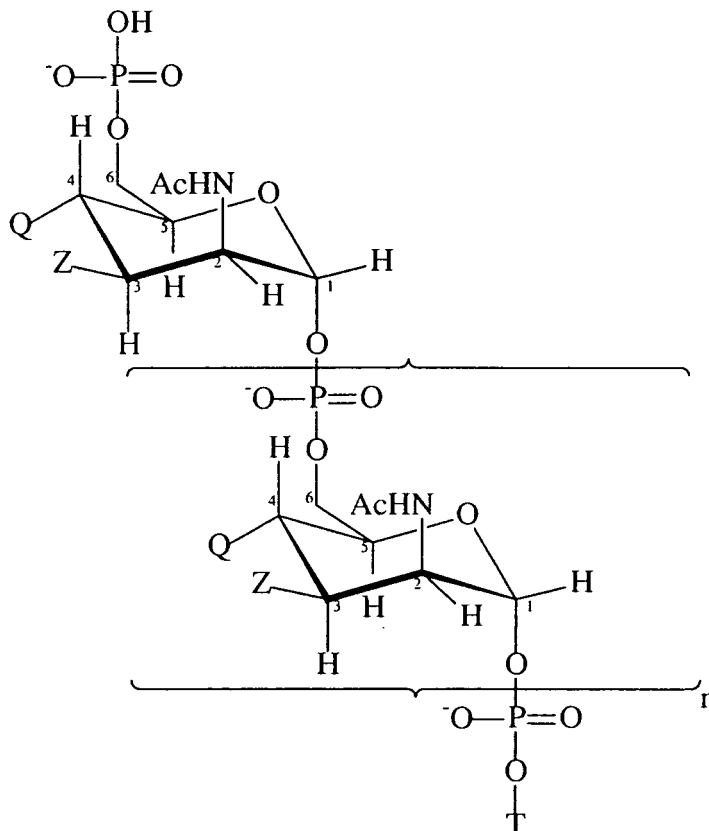
15 Los grupos protectores de nitrógeno divalentes, que pueden utilizarse como E¹E², incluyen derivados de imida cíclicos (tales como N-ftalimidas, N-ditiasuccinimidias, N-2,3-difenilmaleimidias), derivados de imina (tales como N-1,1-dimetiltiometilenaminas, N-bencilidenaminas, N-p-metoxibencilidenaminas, N-difenilmetilenaminas), derivados de enamina (tales como N-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)aminas), etc. Un grupo protector de nitrógeno divalente preferido es N-ftalimidilo.

20 Los grupos protectores de oxígeno adecuados incluyen ésteres, éteres (por ejemplo, silil éteres o alquil éteres) y acetales. Los ejemplos específicos incluyen alilo, acetilo, Alloc, bencilo, benciloximetilo (BOM), t-butilo, tritilo, terc-butildimetilsililo (TBS), terc-butildifenilsililo (TBDPS), trietilsililo (TES), trimetilsililo (TMS), tri-isopropilsililo (TIPS), parametoxibencilo (PMB), MEM, metoximetilo (MOM), MTM y tetrahidropiranilo (THP).

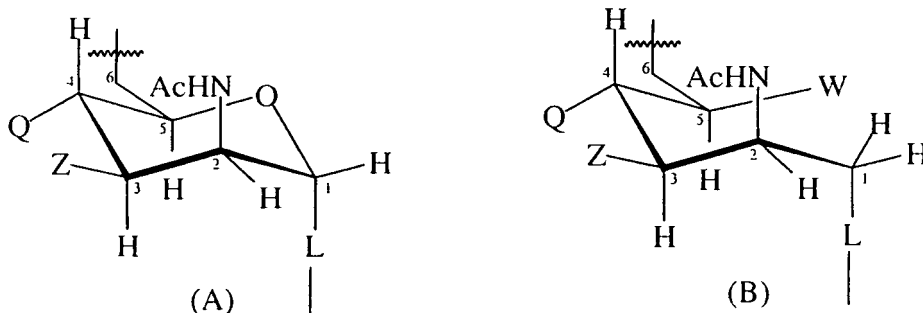
Todos los grupos Z pueden ser OH. Como alternativa, al menos el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 % o el 60 % de los grupos Z pueden ser OAc. Preferentemente, aproximadamente el 70 % de los grupos Z son OAc, siendo el resto de los grupos Z OH o grupos de bloqueo como se han definido anteriormente.

25 Al menos aproximadamente el 7 % de los grupos Q son grupos de bloqueo. Preferentemente, al menos el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 % de los grupos Q son grupos de bloqueo. Como alternativa, todos los grupos Q pueden ser grupos de bloqueo.

La invención también proporciona una molécula que comprende un resto de sacárido de fórmula:



en la que T es de fórmula (A) o (B):



n, Z, Q y W son como se han definido anteriormente, y: L es O, NH, NE, S o Se.

- 5 El enlace covalente libre de L puede unirse a cualquier resto adecuado, por ejemplo a -H, -E, un engarce, una proteína vehículo, etc. L es preferentemente N u O. También es posible que L sea N, unido a un engarce divalente, a un grupo protector divalente o a una proteína vehículo divalente.

Procedimiento para producir un sacárido modificado

La invención proporciona un procedimiento para modificar un sacárido capsular que comprende las etapas de:

- 10 (a) proporcionar un sacárido capsular que tiene al menos un grupo hidroxilo en una unidad de monosacárido; y
(b) convertir dicho al menos un grupo hidroxilo en un grupo de bloqueo.

El grupo de bloqueo puede ser cualquiera de los grupos de bloqueo definidos anteriormente.

El sacárido capsular puede ser un sacárido (oligosacárido o polisacárido) capsular nativo. Como alternativa, el sacárido capsular puede ser, por ejemplo, un sacárido capsular des-O-acetilado y/o un sacárido capsular que tenga un grupo amino terminal (por ejemplo, obtenido por aminación reductora).

- 15 Un procedimiento preferido para la modificación de un sacárido en el que el grupo de bloqueo es $-OCXCONR^1R^2$ es cuando la etapa (b) comprende las etapas de:

- (b1) hacer reaccionar el sacárido capsular con un reactivo bifuncional en un disolvente orgánico; y
(b2) hacer reaccionar el producto de la etapa (b1) con un compuesto amino de fórmula (I):



- 20 en la que R^1 y R^2 son como se han definido anteriormente.

- 25 La expresión "reactivo bifuncional" significa cualquier reactivo que sea capaz de realizar la doble función de (i) proporcionar en la etapa (b1) un primer átomo de carbono electrófilo para el acoplamiento con el grupo o grupos hidroxilo en el sacárido; y (ii) proporcionar un segundo átomo de carbono electrófilo para el acoplamiento con el grupo amino utilizado en la etapa (b2). En general, el segundo átomo de carbono electrófilo se regenera a partir del primer átomo de carbono electrófilo durante la etapa (b). El reactivo bifuncional proporciona un enlace $-C(O)-$ entre el polisacárido y el compuesto amino.

- 30 Los reactivos bifuncionales para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), carbonil di-1,2,4-triazol (CDT), carbonil di-1,2,3-benzotriazol (CDB), carbonato de difenilo, bromuro de cianógeno, fosgeno o trifosgeno. El experto será consciente de que existen otros reactivos bifuncionales que pueden realizar la misma función que éstos.

- 35 Un reactivo bifuncional preferido es CDI. CDI tiene la ventaja de ser un reactivo más suave que, por ejemplo, el fosgeno o el bromuro de cianógeno. En particular, las reacciones de acoplamiento utilizando CDI no generan gases de hidrácidos halogenados, tales como HCl o HBr. La generación de gas de HCl o HBr no es deseable, porque estos gases requieren la limpieza de la salida de la cámara de reacción para evitar su escape a la atmósfera. Por otra parte, la generación de gas de HCl o HBr puede afectar a los grupos funcionales sensibles en el sacárido, dando como resultado una pérdida en los rendimientos debido a la descomposición o fragmentación del sacárido.

- 40 El disolvente orgánico utilizado en la etapa (b1) es preferentemente un disolvente aprótico. Los disolventes apróticos son bien conocidos por el experto en la materia y no contienen átomos de hidrógeno ionizables. Estos disolventes son ventajosos porque facilitan la reacción del grupo o grupos hidroxilo del sacárido con el reactivo bifuncional, mediante la potenciación de la nucleofilia del grupo o grupos hidroxilo. Los disolventes apróticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), formamida, triamida de hexametilsforamida (HMPT), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU), dimetilacetamida (DMAC) o

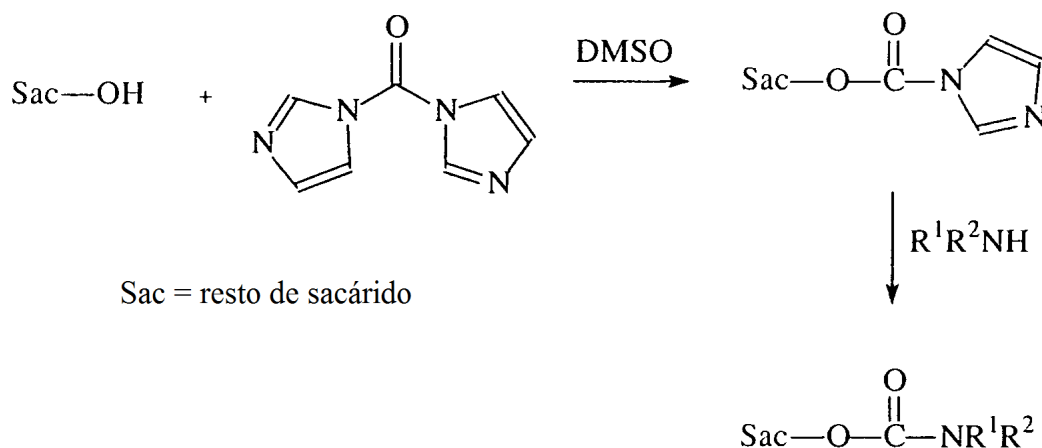
hexametilfosforamida (HMPA). Se prefiere el DMSO.

En la etapa (b2) del procedimiento de la invención, el producto de la etapa (b1) se hace reaccionar con un compuesto amino para formar el polisacárido modificado. El compuesto de amino utilizado en el procedimiento de la presente invención es de fórmula (I), como se ha definido anteriormente. En la fórmula (I), preferentemente, R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-6} . Más preferentemente, R^1 y R^2 son los dos metilo.

Son compuestos de amino adecuados que pueden utilizarse en la invención metilamina, dimetilamina, etilamina, *N*-etilmetilamina, dietilamina, *N*-metilpropilamina, *N*-etilpropilamina, isopropilamina, butilamina, *N*-metil-butilamina, *N*-etilbutilamina, *N*-propilbutilamina, *N*-metilciclopentilamina, *N*-etilciclopentilamina, ciclohexilamina, *N*-metilciclohexilamina, *N*-etilciclohexilamina, bencilamina, *N*-etilbencilamina, *N*-metilbencilamina, isobutilamina, *terc*-butilamina, ciclopentilamina, dibencilamina, pirrolidina, piperidina, morfolina, piperazina, imidazolidina, azetidina, aziridina, anilina, *N*-metilanilina y *N*-etilnilina. Estos pueden utilizarse en forma de sal (por ejemplo sal de clorhidrato).

Preferentemente, el compuesto de amino utilizado en la presente invención es una amina secundaria. Más preferentemente, la amina es dimetilamina.

Un procedimiento preferido de la invención se ejemplifica en el Esquema 1 a continuación:



Esquema 1

En este esquema, el sacárido (por ejemplo, el polisacárido u oligosacárido MenA) se activa primero a través de al menos uno de sus grupos hidroxilo en una unidad de monosacárido con CDI en disolvente DMSO. El carbamato de imidazol intermedio resultante es atrapado por la amina R^1R^2NH (por ejemplo, dimetilamina) para proporcionar el sacárido modificado.

Los sacáridos modificados pueden prepararse como alternativa en un procedimiento de una etapa haciendo reaccionar uno o más grupos hidroxilo en un sacárido capsular con un reactivo de fórmula $XC(O)NR^1R^2$, en el que X es un grupo saliente y R^1 y R^2 son como se han definido anteriormente. Los grupos salientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, $-Cl$, $-Br$, $-CF_3$, $-OC_6F_5$ o $-CCl_3$.

Como alternativa, los sacáridos capsulares modificados de la presente invención pueden prepararse por medios de síntesis, por ejemplo, a partir de unidades de monosacáridos adecuados. Normalmente, la síntesis total de un sacárido capsular modificado comprende la formación de enlaces glucosídicos (por ejemplo, enlaces fosfodiéster) entre unidades de monosacáridos adecuados y después la modificación del sacárido resultante de cualquier manera descrita anteriormente. Como alternativa, las unidades de monosacáridos pueden modificarse antes de formar los enlaces glucosídicos para proporcionar el mismo sacárido capsular modificado.

Los sacáridos capsulares modificados de la presente invención son preferentemente oligosacáridos. A partir de polisacáridos consulares nativos, pueden obtenerse oligosacáridos capsulares modificados mediante cualquiera de dos procedimientos: (1) modificación del polisacárido capsular seguida del dimensionamiento del polisacárido modificado para formar un oligosacárido modificado; o (2) dimensionamiento del polisacárido capsular seguido de la modificación del oligosacárido resultante para formar un oligosacárido modificado. Ambos procedimientos están incluidos dentro de la presente invención. Sin embargo, se prefiere el primer procedimiento, ya que este procedimiento asegura que un grupo hidroxilo terminal estará disponible para la posterior conjugación del oligosacárido modificado con una molécula vehículo, tal como una proteína.

La presente invención también proporciona un procedimiento para la modificación de un polisacárido de *Neisseria meningitidis* del serogrupo A que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo A;
 (b) dimensionamiento de dicho polisacárido para proporcionar un oligosacárido; y
 (c) conversión de al menos un grupo hidroxilo del oligosacárido en un grupo de bloqueo, como se ha descrito anteriormente.

La etapa (b) de este procedimiento puede ir opcionalmente seguida de una etapa o etapas conocidas de derivatización antes de la etapa (c). Las etapas de derivatización conocidas incluyen, por ejemplo, la aminación reductora seguida de la protección del grupo -NH₂ resultante y/o des-O-acetilación.

- 10 La presente invención también proporciona un procedimiento para la modificación de un polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo A que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo A;
 (b) conversión de al menos un grupo hidroxilo del polisacárido en un grupo de bloqueo, como se ha descrito anteriormente; y
 15 (c) dimensionamiento del polisacárido resultante para proporcionar un oligosacárido.

La etapa (c) de este procedimiento puede ir opcionalmente seguida de una etapa o etapas conocidas de derivatización. Las etapas de derivatización conocidas incluyen, por ejemplo, la aminación reductora seguida de la protección del grupo -NH₂ resultante y/o des-O-acetilación.

- 20 Cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente puede ir seguido de una etapa en la que se retiran los contaminantes (por ejemplo, los contaminantes de bajo peso molecular).

Materiales de partida de sacáridos capsulares

- Los sacáridos capsulares modificados de la invención son obtenibles a partir de sacáridos capsulares nativos. La expresión "sacárido capsular nativo" se refiere a polímeros que contienen azúcar (por ejemplo, polímeros de azúcares, ácidos de azúcares, amino azúcares, alcoholes polihídricos, alcoholes de azúcar y fosfatos de azúcar, etc.) que pueden encontrarse en la cápsula de bacterias (tanto grampositivas como gramnegativas), tales como *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Por otra parte, "sacárido capsular nativo" incluye tanto los polisacáridos como los oligosacáridos. Pueden obtenerse oligosacáridos capsulares nativos mediante el dimensionamiento de polisacáridos nativos.

- 30 La "posición de grupo hidroxilo" de un sacárido capsular nativo es una posición en el sacárido capsular nativo que tiene un grupo hidroxilo. Sin embargo, no incluye posiciones en enlaces glucosídicos ni los residuos de los mismos, que tienen grupos hidroxilo (por ejemplo un grupo hidroxilo que es parte de un enlace fosfato no ocupa una posición de grupo hidroxilo). Tampoco se incluyen las posiciones ocupadas por un grupo hidroxilo anomérico en una unidad de monosacárido terminal. Las posiciones donde hay un grupo acetoxi (AcO) en el sacárido capsular nativo tampoco son posiciones de grupos hidroxilo.

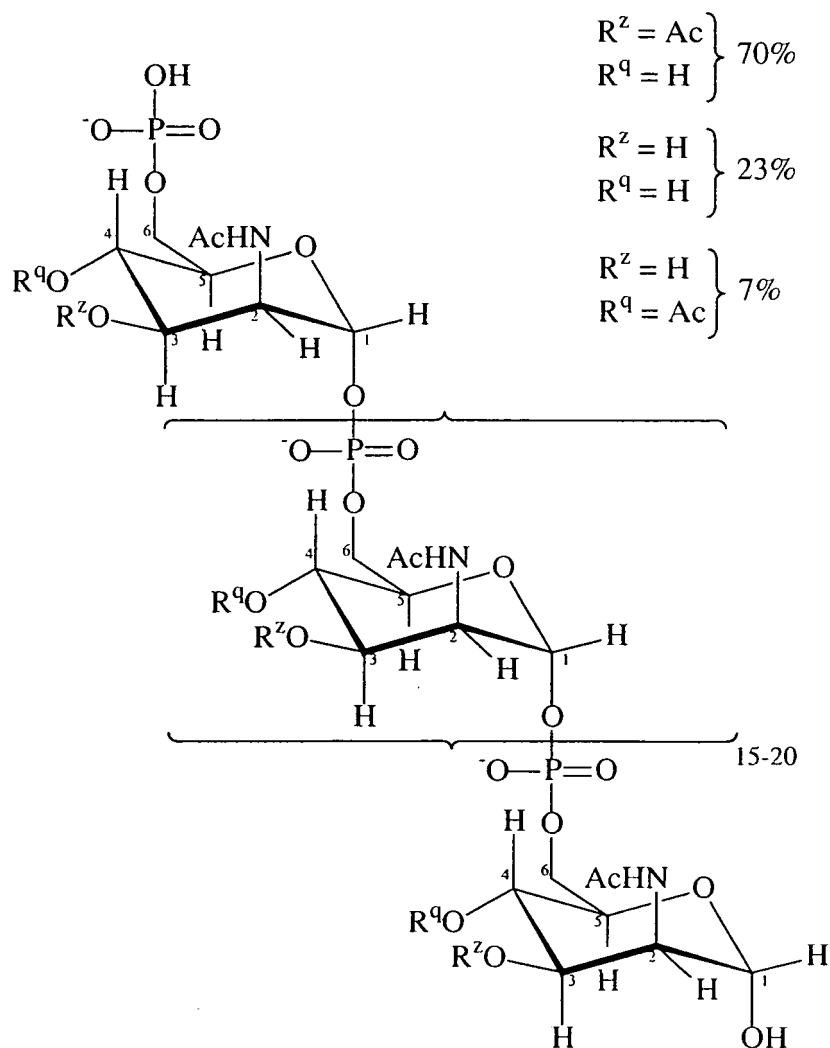
- 35 El sacárido capsular nativo puede comprender unidades de sacárido unidas por enlaces fosfodiéster. Los sacáridos que comprenden enlaces fosfodiéster son inestables frente a la hidrólisis.

El sacárido capsular nativo y el sacárido capsular modificado de la invención son preferentemente inmunogénicos en mamíferos (por ejemplo, seres humanos). El mamífero puede ser un ser humano adulto o un niño.

- 40 El sacárido capsular nativo es preferentemente un polisacárido (o un fragmento de oligosacárido del mismo) de *N. meningitidis* (incluyendo los serogrupos A, B, C, W135 e Y), *S. pneumoniae* (incluyendo los serotipos 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F), *H. influenzae* de tipo B, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus mutans*, *Cryptococcus neoformans*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y/o *Pseudomonas aeruginosa*.

- 45 Aunque la invención puede ser aplicable a cualquier serogrupo de *N. meningitidis*, se prefiere utilizar un sacárido capsular del serogrupo A ("MenA"). El sacárido capsular MenA es particularmente inestable en solución acuosa, lo que significa que deben utilizarse procedimientos especiales para realizar manipulaciones químicas (por ejemplo, la conjugación con proteínas vehículo) en esta molécula. Sin embargo, se ha descubierto que los sacáridos MenA modificados de acuerdo con la invención son ventajosamente estables en solución acuosa.

- 50 El polisacárido capsular MenA {→6)-D-ManpNAc(3/4OAc)-α-(1→OPO₃→} se compone de restos de N-acetilmanosamina unidos entre sí por enlaces fosfodiéster α1-6 que tienen las unidades de repetición que se muestran a continuación.



De acuerdo con las definiciones anteriores, el 93 % de las posiciones 4 son posiciones de grupos hidroxilo y el 30 % de las posiciones 3 son posiciones de grupos hidroxilo. El grupo 1-hidroxi terminal también ocupa una posición de grupo hidroxilo. El grupo 1-hidroxi terminal es un grupo hidroxilo anomérico terminal. El grupo hidroxilo que es parte del grupo -OP(O)(OH)O- no es una posición de grupo hidroxilo.

Conjugados sacárido-proteína

Los sacáridos modificados de la invención pueden someterse a cualquier procesamiento corriente abajo habitual que se aplique a sacáridos (por ejemplo, derivatización, conjugación, fragmentación, etc.). Para potenciar la inmunogenicidad, los sacáridos modificados de la invención se conjugan preferentemente con una proteína vehículo. La conjugación a proteínas vehículo es particularmente útil para vacunas pediátricas [7] y es una técnica bien conocida [por ejemplo, revisado en las referencias 8-16 etc.].

La invención proporciona por tanto un conjugado de una proteína y un sacárido modificado de la invención. La proteína puede conjugarse con el sacárido directamente o puede utilizarse un engarce. Puede utilizarse cualquier engarce químico adecuado. La estabilidad mejorada del polisacárido modificado permite que se utilice ventajosamente una amplia gama de enlaces.

Como se ha descrito anteriormente, se prefiere que el sacárido capsular modificado tenga al menos un grupo hidroxilo o grupo amino libre que pueda utilizarse como asa para el posterior enlace a una proteína vehículo.

Un sacárido capsular modificado que tiene un grupo hidroxilo libre puede obtenerse mediante el bloqueo selectivo de grupos hidroxilo en un sacárido capsular o mediante el desbloqueo selectivo de un sacárido capsular modificado en el que todos los grupos hidroxilo están bloqueados. Como alternativa, puede revelarse un grupo hidroxilo libre mediante el dimensionamiento de un sacárido capsular modificado. Preferentemente, el al menos un grupo hidroxilo libre es un grupo hidroxilo anomérico terminal. Se prefiere el grupo hidroxilo anomérico terminal como grupo hidroxilo libre porque un grupo hidroxilo anomérico terminal puede revelarse mediante el dimensionamiento de un sacárido capsular modificado.

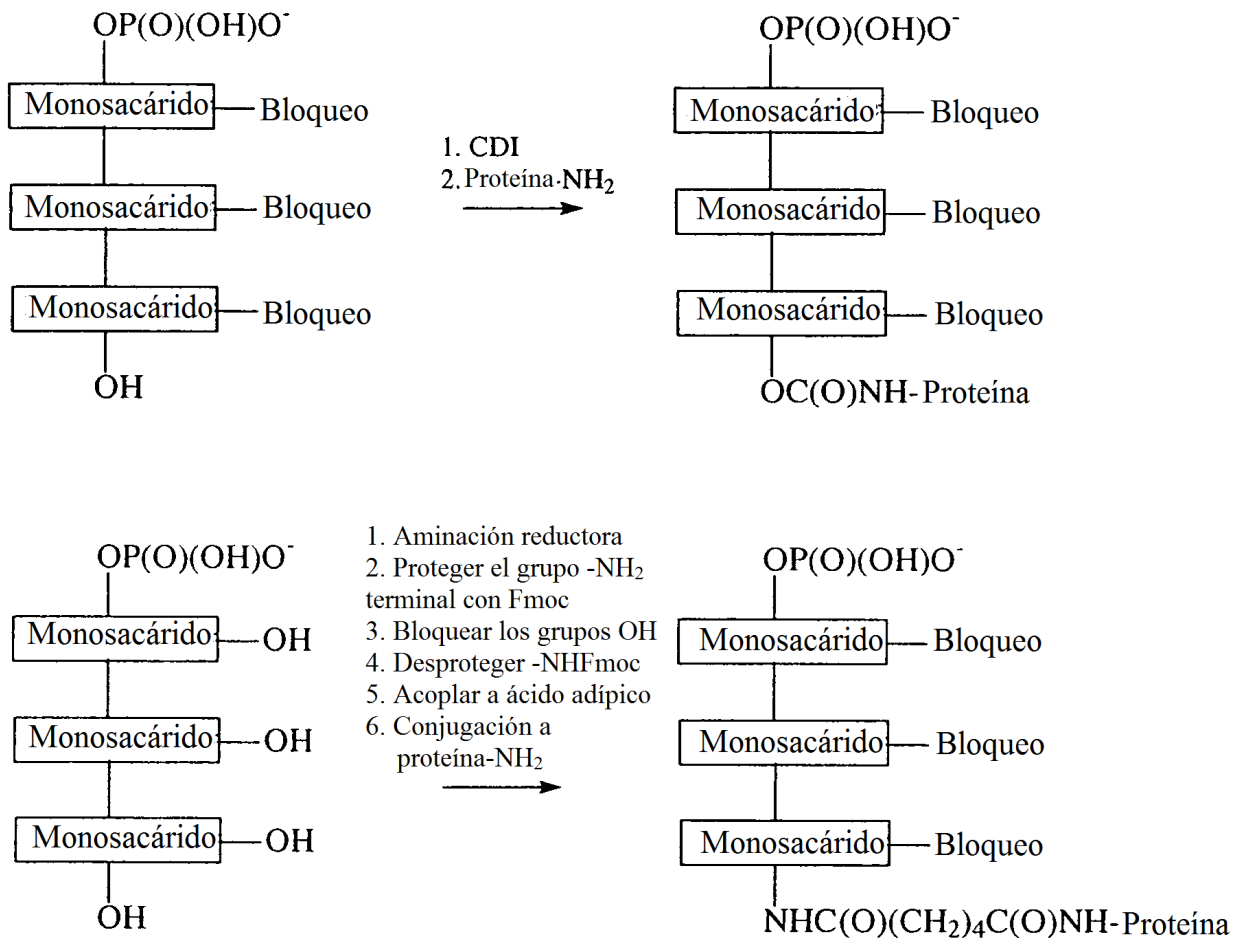
5 Un sacárido capsular modificado que tiene un grupo amino libre puede obtenerse por aminación reductora de un grupo hidroxilo anomérico terminal, opcionalmente seguida de la protección del grupo -NH₂ resultante. La reacción de aminación reductora puede realizarse antes o después de la etapa de modificación de la presente invención. Preferentemente, la aminación reductora se realiza antes de la etapa de modificación de la presente invención ya que el grupo -NH₂ resultante puede protegerse/desprotegerse selectivamente en presencia de grupos hidroxilo/grupos de bloqueo.

Los enlaces directos a la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido seguida de la aminación reductora con la proteína, como se describe en, por ejemplo, las referencias 2 y 4.

10 Los enlaces a través de un grupo de engarce pueden hacerse utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 3 y 5. Un tipo de enlace preferido es un engarce de carbonilo, que puede formarse mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido modificado con CDI [17, 18] seguida de la reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otro tipo de enlace preferido es un engarce de ácido adípico, que puede formarse mediante el acoplamiento de un grupo -NH₂ libre en el sacárido modificado con ácido adípico (utilizando, por ejemplo, la activación de diimida) y después el acoplamiento de una
15 proteína con el intermedio sacárido-ácido adípico resultante. [12, 19, 20]. Otros engarces incluyen B-propionamido [21], nitrofenil-etilamina [22], haluros de haloacilo [23], enlaces glucosídicos [24], ácido 6-aminocaproico [25], ADH [26], restos C₄ a C₁₂ [27] etc.

20 La conjugación puede implicar: la reducción del extremo anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario; la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermedio de carbamato de CDI; y el acoplamiento del intermedio de carbamato de CDI con un grupo amino en una proteína.

El esquema 2 muestra dos ejemplos diferentes de cómo un sacárido capsular puede conjugarse con una proteína vehículo, de acuerdo con la presente invención. En el primer ejemplo, la proteína está conjugada a través de un grupo hidroxilo terminal. En el segundo ejemplo, la proteína está unida a través de un grupo amino terminal.



-Bloqueo es un grupo de bloqueo

Esquema 2

Las proteínas vehículo preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoides diftéricos o tetánicos. Estos se utilizan habitualmente en las vacunas conjugadas. El toxoide diftérico CRM₁₉₇ se prefiere en particular [28]. Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [29], péptidos sintéticos [30,31], proteínas de choque térmico [32,33], proteínas pertúsicas [34,35], la proteína D de *H. influenzae* [36], citocinas [37], linfocinas [37], hormonas [37], factores de crecimiento [37], toxina A o B de *C. difficile* [38], proteínas de captación de hierro [39] etc. Es posible utilizar mezclas de proteínas vehículo.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados pueden separarse. Existen muchos procedimientos adecuados, incluyendo la cromatografía hidrófoba, la ultrafiltración tangencial, la diafiltración etc. [véanse también las referencias 40, 41, etc.].

Una proteína vehículo única puede llevar múltiples sacáridos diferentes [42].

Composiciones y procedimientos farmacéuticos

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un sacárido modificado de la invención y/o un conjugado de la invención y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Cuando está presente un conjugado, la composición también puede comprender proteína vehículo libre [43].

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente grandes, macromoléculas que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos

polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos, trehalosa [44], agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivos. Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Un análisis completo de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Normalmente, las composiciones se preparan en forma de inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección también. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas para potenciar el efecto adyuvante. La administración directa de las composiciones será, en general, por vía parenteral (por ejemplo, por inyección, ya sea subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se entregará al espacio intersticial de un tejido). Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, rectal (supositorios) y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas [por ejemplo, Ref. 45], agujas y hipopulverizaciones. La pauta de dosificación puede ser un programa de dosis única o de dosis múltiple (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo).

La composición de la invención es preferentemente estéril, tamponada y/o apirógena.

La composición es preferentemente una composición inmunógena (por ejemplo, una vacuna). Las vacunas a base de sacáridos o conjugados sacárido-proteína son bien conocidas en la técnica.

Las composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno sacarídico, así como cualquier otro de los otros componentes especificados, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se quiere decir que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que se trata, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se trata por ejemplo, (primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración de la situación médica por parte del médico especialista y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté incluida en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos frecuentes. La pauta de dosificación puede ser un programa de dosis única o de dosis múltiple (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo). La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

La composición inmunogénica puede incluir un adyuvante. Los adyuvantes preferidos para potenciar la eficacia de la composición incluyen, pero no se limitan a: (A) compuestos de aluminio, por ejemplo, hidróxidos de aluminio (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos de aluminio, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la Ref. 46] o mezclas de diferentes compuestos de aluminio, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, forma de gel, cristalina, amorfa, etc.) y prefiriéndose la adsorción; (B) MF59 (escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 %, formulados en partículas submicrométricas utilizando un microfluidificador) [véase el capítulo 10 de la Ref. 46; véase también la Ref. 47]; (C) liposomas [véanse los Capítulos 13 y 14 de la Ref. 46]; (D) ISCOM [véase el capítulo 23 de la Ref. 46], que puede estar desprovisto de un detergente adicional [48]; (E) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, L121 polímero de bloque con Pluronic al 5 % y thr-MDP, ya sea microfluidificado en una emulsión submicrométrica o agitado con formación de vórtice para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula [véase el capítulo 12 de la Ref. 46]; (F) sistema adyuvante RibitTM (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DetoxTM); (G) adyuvantes de saponina, tales como QuilA o QS21 [véase el capítulo 22 de la Ref. 46], también conocido como StimulonTM; (H) quitosano [por ejemplo, 49]; (I) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (J) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc. [véanse los capítulos 27 y 28 de la Ref. 46]; (K) micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 μ m de diámetro y mucho más preferentemente de ~500 nm a ~10 μ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y atóxicos (por ejemplo, un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona etc.); (L) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) [por ejemplo, capítulo 21 de la Ref. 46]; (M) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [50]; (N) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG [51] es decir, que contienen al menos un dinucleótido CG, utilizándose 5-metilcitosina opcionalmente en lugar de citosina, y/o motivo CI; (O) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno [52]; (P) un tensioactivo de éster de sorbitano polioxietilenado en combinación con un octoxinol [53] o un polioxietileno alquil éter o tensioactivo de éster en combinación con al menos un agente tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [54]; (Q) un oligonucleótido inmunoestimulante (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) y una saponina [55]; (R) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica [56]; (S) una saponina y una emulsión de aceite-en-agua; (T) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [58]; (U) la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* ("LT") o mutantes destoxificados de los mismos, tales como los mutantes K63 o R72 [por ejemplo, Capítulo 5 de la Ref. 59]; (V) la toxina colérica ("CT") o mutantes destoxificados de la misma [por ejemplo, Capítulo 5

- de la Ref. 59]; (W) y miméticos del monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529 [60]; (X) polifosfaceno (PCPP); (Y) un bioadhesivo [61] tal como microesferas de ácido hialurónico esterificado [62] o un mucoadhesivo seleccionado entre el grupo que consiste en derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa; o (Z) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la eficacia de la composición [por ejemplo, véase el Capítulo 7 de la Ref. 46]. El alumbre (especialmente fosfatos y/o hidróxidos de aluminio) es un adyuvante preferido. Los péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxfosforilo)etilamina MTP-PE), etc.
- Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos que se tratan pueden ser animales; en particular, pueden tratarse sujetos humanos. Las vacunas son particularmente útiles para vacunar a niños y adolescentes.
- Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser tanto profilácticas (es decir para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad después de la infección), pero normalmente serán profilácticas.
- Además de los sacáridos modificados, la composición puede comprender otros componentes antigénicos. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más sacáridos (estén o no modificados de acuerdo con la invención). Por ejemplo, la composición puede comprender sacáridos de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis* (por ejemplo, además de un sacárido modificado MenA). Estos normalmente estarán conjugados con proteínas vehículo y pueden conjugarse sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* con las mismas o diferentes proteínas vehículo. Cuando una mezcla comprenda sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, se prefiere que la relación (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC sea mayor que 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior). Se ha observado una mejora de la inmunogenicidad del componente MenA cuando está presente en exceso (masa/dosis) respecto al componente MenC. [63]
- La composición también puede comprender antígenos proteínicos.
- Los antígenos que pueden incluirse en la composición de la invención incluyen:
- antígenos de *Helicobacter pylori* tales como CagA [64 a 67], VacA [68, 69], NAP [70, 71, 72], HopX [por ejemplo 73], HopY [por ejemplo, 73] y/o ureasa.
 - un antígeno proteínico de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como los de las Ref. 74 a 80, prefiriéndose en particular la proteína '287' (véase a continuación) y derivados (por ejemplo, 'ΔG287').
 - una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) a partir de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como las descritas en las referencias. 81, 82, 83, 84 etc.
 - un antígeno sacarídico de *N. meningitidis* serogrupo C, tal como el oligosacárido descrito en la Ref. 85 del serogrupo C [véase también la Ref. 86].
 - un antígeno sacarídico de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo 87, 88, 89].
 - un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como el virus inactivado [por ejemplo 90, 91].
 - un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos superficiales y/o nucleares [por ejemplo 91, 92].
 - un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo 93].
 - un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina pertúsica (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o los aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, las Ref. 94 y 95].
 - un antígeno de difteria, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 3 de la Ref. 96] por ejemplo el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo 97].
 - un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de la Ref. 96].
 - un antígeno sacarídico de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, 86].
 - un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo 74, 75, 76].
 - un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104].
 - un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 105].
 - un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 106].
 - antígeno o antígenos de la polio [por ejemplo, 107, 108] tales como IPV u OPV.
 - antígeno o antígenos de la rabia [por ejemplo, 109] tales como el virus inactivado liofilizado [por ejemplo, 110, RabAvert™].
 - antígenos de sarampión, paperas y/o rubéola [por ejemplo capítulos 9, 10 y 11 de la Ref. 96].
 - antígeno o antígenos de la gripe [por ejemplo, el capítulo 19 de la Ref. 96], tales como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
 - un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 111].
 - un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 112, 113].
 - un antígeno sacarídico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B).
 - un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo, 113, 114, 115].
 - un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 116].
 - un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo, 117, 118, 119].
 - un antígeno de un virus de la familia flaviviridae (género flavivirus), tal como por ejemplo el virus de la fiebre

amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, cuatro serotipos del virus del dengue, el virus de la encefalitis por garrapatas, el virus del Nilo Occidental.

- un antígeno de pestivirus, tal como el virus de la fiebre porcina clásica, el virus de la diarrea viral bovina, y/o el virus de enfermedad de la frontera.

- 5
- un antígeno de parvovirus por ejemplo, de parvovirus B 19.
 - una proteína priónica (por ejemplo la proteína priónica de la ECJ)
 - una proteína amiloide, tal como un péptido beta [120]
 - un antígeno de cáncer, tal como los enumerados en la Tabla 1 de la Ref. 121 o en las Tablas 3 y 4 de la Ref. 122.

10 La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales.

Los antígenos proteínicos tóxicos pueden destoxificarse cuando sea necesario (por ejemplo destoxificación de toxina pertúsica por medios genéticos y/o químicos [95]).

15 Cuando hay un antígeno diftérico incluido en la composición se prefiere incluir también el antígeno tetánico y antígenos pertúsicos. De forma similar, cuando se incluye un antígeno químico se prefiere incluir también antígenos diftéricos y pertúsicos. De forma similar, cuando se incluye un antígeno pertúsico se prefiere también incluir antígenos diftéricos y tetánicos.

Los antígenos preferentemente se adsorben en una sal de aluminio.

20 Los antígenos en la composición normalmente estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmune contra ese antígeno.

Como alternativa al uso de antígenos proteínicos en la composición de la invención, puede utilizarse el ácido nucleico que codifique el antígeno [por ejemplo, las Ref. 123-131]. Los componentes proteínicos de las composiciones de la invención pueden por tanto sustituirse por el ácido nucleico (preferentemente ADN por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifique la proteína.

25 La invención también proporciona un procedimiento para generar una respuesta de anticuerpos en un mamífero, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al mamífero. El mamífero es preferentemente un ser humano. El ser humano puede ser un adulto o, preferentemente, un niño. La respuesta de anticuerpos es preferentemente protectora contra la infección por *N. meningitidis* serogrupo A.

30 La invención también proporciona un procedimiento para la inmunización de un mamífero, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al mamífero.

Esta invención también proporciona un sacárido modificado de la invención o un conjugado de la invención, para su uso como medicamento.

35 La invención también proporciona el uso de un sacárido modificado de la invención o de un conjugado de la invención, en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad provocada por bacterias encapsuladas. Las enfermedades provocadas por *Neisseria* incluyen la meningitis, la septicemia y la gonorrea. Las enfermedades provocadas por *H. influenzae* incluyen la otitis media, la bronquitis, la neumonía, la celulitis, la pericarditis y la meningitis. Las enfermedades provocadas por el neumococo incluyen la meningitis, la sepsis y la neumonía. Se prefieren por tanto la prevención y/o el tratamiento de la meningitis bacteriana.

Definiciones

40 La expresión "que comprende" significa "que incluye" así como "que consiste en" por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

45 Se apreciará que los anillos de azúcar pueden existir en forma abierta y cerrada y que, aunque en las fórmulas estructurales del presente documento se muestran las formas cerradas, las formas abiertas también están incluidas en la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el *GPpromedio* de muestras de MenA después de la incubación a 37, 49 y 57 °C representado en función del tiempo (h).

50 La Figura 2 muestra el *GPpromedio* de muestras MenA-CDI-DMA después de la incubación a 37, 49, 57 °C representado en función del tiempo (h).

La Figura 3 muestra un gráfico de apilado de espectros de RMN ³¹P a 242,9 MHz de muestras de MenA-CDI-

DMA incubadas a 57 °C durante 0, 24, 48, 72, 96 horas. Se indican algunas marcas de señal.

La Figura 4 muestra el diagrama de *GPpromedio* frente al tiempo para comparar los procedimientos analíticos colorimétrico y de RMN ³¹P.

La Figura 5 muestra el *GPpromedio* de sacáridos MenA nativos y modificados a 2-8 °C a lo largo del tiempo.

5 La Figura 6 muestra el espectro a 600 MHz de RMM ¹H marcado de MenA-CDI-DMA a 298 K. Se indican algunas asignaciones.

La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo de ELISA competitivo realizado utilizando oligosacáridos MenA, MenA-CDI y MenA-CDI-DMA como agente de recubrimiento. La concentración de competidores varió de 10⁹ a 10⁻⁷ mg/ml.

10 La Figura 8 ilustra el esquema de reacción para la conjugación de oligosacáridos MenA.

La Figura 9 muestra el espectro a 600 MHz de RMM ¹H a 25 °C de MenA modificado activado. Se indican algunas marcas de señal.

15 Las Figuras 10A y 10B muestran los espectros de RMN ¹H, ¹³C hetero-correlacionados a 25 °C de MenA modificado activado. Tanto en la Figura 10A como en la 10B, el eje X se extiende aproximadamente desde 5,7 ppm a la izquierda hasta 1,8 ppm a la derecha. En la Figura 10A, el eje Y se extiende aproximadamente desde 145 ppm en la parte superior hasta 185 ppm en la parte inferior; en la Figura 10B se extiende aproximadamente desde 5 ppm en la parte superior hasta 105 ppm en la parte inferior.

La Figura 11 muestra espectros de RMN ¹H superpuestos de MenA DP4 modificado activado y MenA DP4 nativo activado (sin la modificación química por CDI y DMA).

20 La Figura 12 muestra un espectro de RMN ³¹P a 243 MHz a 25 °C de MenA modificado activado.

Las Figuras 13 y 14 muestran el aspecto del sacárido libre debido a la hidrólisis de los conjugados almacenados a 37 °C durante un período de cuatro semanas. Los sacáridos modificados se muestran como cuadrados, los naturales como triángulos vacíos.

25 La Figura 15 muestra el aspecto del sacárido libre debido a la hidrólisis de los conjugados almacenados a 37 °C durante cuatro semanas a varios pH. La columna de la izquierda de cada par muestra el oligosacárido nativo.

La Figura 16 muestra los títulos de IgG anti-MenA-pS inducidos por (de izquierda a derecha) los conjugados del lote 3, lote 5 y lote 002011. Las barras muestran los límites del 95 % de confianza.

30 La Figura 17 muestra el análisis de las subclases de IgG de los sueros combinados de la inmunización con conjugados de MenA modificados y sin modificar (lotes 3, 5 y 002011). Los valores son la DO_{405 nm} multiplicada por 1000.

35 La Figura 18 muestra los resultados de un ELISA competitivo utilizando MenA pS como competidor. El eje Y muestra los valores de DO_{405 nm} multiplicados por 1000. El eje X muestra la dilución de suero recíproca. El oligosacárido MenA sin modificar se muestra en círculos; los sacáridos modificados se muestran en cuadrados (lote 3) y en triángulos (lote 5). Los símbolos vacíos muestran datos sin polisacárido competidor; los símbolos rellenos muestran los datos en presencia de polisacárido competidor.

Modos de realización de la invención

Modificación del oligosacárido MenA

40 El polisacárido capsular se purificó a partir de MenA y se hidrolizó para proporcionar el oligosacárido MenA. El polisacárido (2 g) se hidrolizó a 50 °C en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 4,75, a una concentración de polisacárido de 10 mg/ml durante aproximadamente 4 horas [86]. Después de la hidrólisis, la solución se secó por evaporación rotatoria.

45 El oligosacárido se activó utilizando el esquema de reacción mostrado anteriormente en el Esquema 1. El oligosacárido se disolvió en DMSO para proporcionar una concentración de sacárido de 10 mg/ml. De acuerdo con una relación molar de oligosacárido:CDI de 1:20, se añadieron a continuación, 21,262 g de CDI (Sigma™) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El compuesto MenA-CDI resultante se purificó por precipitación selectiva en una mezcla de acetona:DMSO 80:20: (v/v) seguida de centrifugación. La eficiencia de la reacción de activación se calculó que era aproximadamente el 67,9 % mediante la determinación de la relación de imidazol libre a imidazol unido.

50 En la segunda etapa de reacción, el oligosacárido MenA-CDI se solubilizó en DMSO a una concentración de sacárido de aproximadamente 10 mg/ml. De acuerdo con una relación molar de unidad de MenA-CDI:DMA de 1:100 se

añadieron 36,288 g de clorhidrato de dimetilamina al 99 % (Sigma™) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El producto de reacción se liofilizó y volvió a solubilizar en solución acuosa 10 mg/ml.

- 5 Para retirar el reactivo de reacción de bajo peso molecular (en particular la dimetilamina (DMA)) de la preparación de oligosacárido, se realizó una etapa de diálisis a través de una membrana MWCO de 3,5 kDa (Spectra/Por®). Se realizaron cuatro etapas de diálisis: (i) 16 horas frente a 2 l de cloruro de sodio 1 M (factor de diálisis 1:20), (ii) 16 horas frente a 2 l de cloruro de sodio 5 M (factor de diálisis 1:20), (iii) y (iv) 16 horas frente a 2 l de WFI (factor de diálisis 1:20). Para mejorar la purificación se realizó también una etapa de diafiltración a través de una membrana MWCO de 1 kDa (Centricon™).

El producto MenA-CDI-DMA purificado se tamponó a pH 6,5 en L-histidina 25 mM (Fluka™).

- 10 La estabilidad de los productos MenA y MenA-CDI-DMA se evaluó mediante el uso de procedimientos colorimétricos y de RMN para determinar su grado de polimerización promedio (*GPpromedio*). Las muestras se incubaron en viales de vidrio en tampón His 25 mM, pH 6,5, durante 96 horas a una de las tres temperaturas (37, 49 o 57 °C) y, al final del período de incubación, las muestras se almacenaron a 4 °C.

Estudio colorimétrico de estabilidad

- 15 El *GPpromedio* químico se expresó por la relación $[P_t]/[P_{me}]$, en la que $[P_t]$ es la concentración total de fósforo y $[P_{me}]$ es la concentración de fosfato de monoéster terminal. $[P_t]$ se determinó colorimétricamente como se describe en la Ref. 132. $[P_{me}]$ se determinó midiendo el fosfato inorgánico P_i liberado por la reacción enzimática con fosfatasa ácida de patata [133].

Las Figuras 1 y 2 muestran los *GPpromedio* de MenA y MenA-CDI-DMA en función del tiempo (t).

- 20 Se analizaron las constantes cinéticas (k) de la hidrólisis sacarídica (se observa en las Figuras 1 y 2 como la caída del *GPpromedio*) como se describe en la referencia 134. Se analizaron dos aspectos distintos de k:

- k en función de *GPpromedio* y t en la ecuación cinética convencional; y después
- k en función del factor de frecuencia (A), la energía de activación (ΔG_a) y la temperatura (T) en la ecuación de Arrhenius.

- 25 Se asumió que la hidrólisis transcurrió hasta su finalización con cinética de primer orden satisfactoria:

$$\frac{dGPprom}{dt} = -kGPprom$$

$$GPprom = GPprom_0 \exp(-kt)$$

en la que $GPprom_0 = GPprom$ a $t = 0$. La forma logarítmica es: $\ln GPprom = \ln GPprom_0 - kt$, k se define por la pendiente de la representación de $GPprom = f(t)$.

- 30 La ecuación de Arrhenius indica la correlación entre las constantes cinéticas a diversos valores de temperatura y la energía de activación para la reacción de hidrólisis:

$$k = A \exp(-\Delta G_a / RT)$$

$$\ln k = \ln A - \Delta G_a / RT$$

- 35 en la que $R = 8,314 \times 10^{-3}$ KJ/mol K. ΔG_a se calcula a partir de la pendiente de la línea recta obtenida representando $\ln k$ en función de la temperatura recíproca (1/T). En este estudio se analizaron únicamente la energía de activación total de la reacción de hidrólisis, sin la separación de las contribuciones individuales de la entalpía de activación y la entropía de activación ($\Delta G_a = \Delta H_a + T\Delta S_a$).

La Tabla 1 resume los datos colorimétricos de *GPprom* y las constantes cinéticas de la reacción de hidrólisis a diversas temperaturas:

	T (K)	<i>GPprom</i>					K (s ⁻¹)
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
MenA	310	21,453	17,452	14,197	11,550	9,396	2,4 x 10 ⁻⁶
	322	21,453	14,028	9,173	5,998	3,922	4,9 x 10 ⁻⁶
	330	21,453	10,956	5,595	2,857	1,459	7,8 x 10 ⁻⁶
MenA-CDI-DMA	310	21,453	21,192	20,994	19,524	18,640	1,9 x 10 ⁻⁷
	322	21,453	22,410	19,127	17,472	15,491	9,2 x 10 ⁻⁷
	330	21,453	20,227	16,555	13,864	11,600	1,8 x 10 ⁻⁶

Las representaciones de Arrhenius de las constantes de velocidad obtenidas a 37, 49 y 57 °C, indicaron que la energía de activación de la reacción de hidrólisis en tampón His 25 mM, pH 6,5, era de 50,1 KJ/mol (12,0 Kcal/mol) para MenA y 94,9 KJ/mol (22,7 Kcal/mol) para Mena-CDI-DMA. Los errores típicos, que se estimaron por regresión lineal de mínimos cuadrados de las representaciones de Arrhenius, eran de $\pm 5,0$ KJ/mol ($\pm 1,2$ Kcal/mol) para los valores de ΔG_a . Por tanto, el polisacárido modificado de la invención era casi dos veces más estable que su homólogo sin modificar.

Estudio de estabilidad por NMR

Con el fin de verificar el GP_{prom} obtenido mediante el procedimiento colorimétrico, se realizaron experimentos analíticos de RMN ^{31}P . Los datos de GP_{prom} se calcularon por la relación de integración entre las señales de P_{me} y $P_{en\ cadena}$ (véase la Figura 3).

Las muestras de RMN 1H y ^{31}P se prepararon disolviendo oligosacáridos liofilizados en 0,75 ml de D_2O al 99,9 % (Aldrich™) para proporcionar soluciones concentradas a 10-15 mM. En todos los experimentos, se utilizaron tubos Wilmad™ de RMN de 5 mm. Los espectros de RMN se registraron a 298 K en un espectrómetro Bruker™ NMR Spectrometer Avance DRX a 600 MHz con una unidad de BGU. Se utilizó una sonda de triple resonancia TBI de 5 mm con gradientes-z auto blindados. Para el procesamiento de datos se utilizó el software Bruker XWINNMR 3.0. Las condiciones de obtención espectral convencionales de 1H eran recoger 32 mil puntos de datos en una ventana espectral de 6000 Hz con 4 exploraciones. Los espectros de RMN 1H se transformaron por Fourier después de aplicar una función de ensanchamiento de línea de 0,1 Hz y se referenciaron en relación con la resonancia del anión acetato a 1,91 ppm o la del agua monodeuterada a 4,72 ppm. Las condiciones de obtención espectral convencionales de ^{31}P eran para recoger 32 mil puntos de datos a través de una ventana espectral de 3000 Hz con 128 exploraciones. Se utilizó una función de ensanchamiento de línea de 2,0 Hz.

Como se muestra en la Figura 4, los procedimientos colorimétricos y de RMN ^{31}P concordaban para todos los valores de temperatura, con solo un ligero desplazamiento a la baja evidente (sin efectos en $\ln GP_{prom} = f(t)$).

Los resultados de los procedimientos colorimétricos y de RMN ^{31}P de análisis se resumen en la Tabla 2:

Procedimiento analítico	T (K)	GP_{prom}					k (s ⁻¹)
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
Determinación colorimétrica	310	21,453	21,192	20,994	19,524	18,640	$1,9 \times 10^{-7}$
	322	21,453	22,410	19,127	17,472	15,491	$9,2 \times 10^{-7}$
	330	21,453	20,227	16,555	13,864	11,600	$1,8 \times 10^{-6}$
Determinación por RMN ^{31}P	310	20,407	19,573	19,170	18,450	18,253	$3,3 \times 10^{-7}$
	322	20,407	16,986	14,836	12,556	10,051	$2,0 \times 10^{-6}$
	330	20,407	15,984	12,123	9,860	8,079	$2,7 \times 10^{-6}$

Mediante la mejorar del análisis de la forma espectral del P_{me} , se observó que se generaban dos especies moleculares diferentes (véase la Figura 3). Era evidente una velocidad constante cinética más baja para la señal ascendente.

Mediante la extrapolación de los datos adquiridos a temperatura inferior (por ejemplo la temperatura de almacenamiento convencional de 2 a 8 °C), fue posible extrapolar estos datos a una escala de tiempo de 2 años (véase la Figura 5).

Comparando los resultados obtenidos mediante estos ensayos acerca de la estabilidad de MenA y MenA-CDI-DMA, se observó un aumento significativo de la estabilidad del producto modificado. La extrapolación a una escala de tiempo más largo indicó que la degradación de MenA-CDI-DMA se reducía suficientemente para permitir la distribución del producto durante 2 años.

Caracterización estructural

La Figura 6 muestra un espectro de RMN 1H de una muestra de MenA-CDI-DMA a 298 K con asignaciones indicativas de señales. El perfil de RMN señaló una alta similitud entre el oligosacárido MenA y el oligosacárido MenA-CDI-DMA. Se observaron señales de metilo- 1H de DMA en la región espectral de 2,6-3 ppm. El pico de 2,73 ppm correspondía al metilo- 1H del DMA libre, como reactivo residual en solución. El pico de 2,91 ppm se asignó tentativamente como el enlace de metilo- 1H de DMA a la cadena de oligosacáridos.

Los perfiles de RMN ^{31}P eran similares al oligosacárido MenA. Sólo se observó un corto desplazamiento descendente de la señal de P_{me} (véase Figura 3).

Los sacáridos modificados de la invención eran por tanto estructuralmente similares a sus homólogos nativos, lo que significa que la antigenicidad y la inmunogenicidad no se vieron afectadas.

Ensayos de ELISA competitivos

Se utilizó un ensayo de ELISA competitivo para correlacionar los oligosacáridos MenA, MenA-CDI y MenA-CDI-DMA con su capacidad para desplazar anticuerpos específicos. El % de inhibición representado en función de la concentración de competidor (mg/ml) se muestra en la figura 7. Todas las muestras mostraron un comportamiento similar, alcanzando aproximadamente el 100 % de inhibición a una concentración competidor de 10^{-1} mg/ml.

Esto confirma que la modificación de sacáridos utilizando la invención no dio como resultado la pérdida de antigenicidad.

Conjugación

El sacárido MenA modificado (MenA-CDI-DMA) se conjugó con la proteína CRM₁₉₇ mediante el procedimiento que se resume en la Figura 8. Las etapas básicas del procedimiento de conjugación son:

- la hidrólisis de los polisacáridos MenA para proporcionar fragmentos de oligosacáridos
- dimensionamiento de los fragmentos de oligosacáridos
- aminación reductora de grupos aldehído terminales en los oligosacáridos dimensionados
- protección de grupos -NH₂ terminales mediante el grupo Fmoc antes de la reacción con CDI
- desprotección intrínseca de los grupos -NH₂ durante la reacción con DMA
- activación de grupos -NH₂ terminales mediante SIDEA (ácido N-hidroxisuccinimida adípico)
- unión covalente a la proteína CRM₁₉₇

a) Hidrólisis

El polisacárido MenA se hidrolizó en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4,75 durante aproximadamente 3 horas a 73 °C. La hidrólisis se controló con el fin de obtener oligosacáridos con un grado medio de polimerización (GP) de aproximadamente 15, como se determinó por la relación (p/p) entre el fósforo orgánico total y el fosfato de monoéster.

b) Dimensionamiento

Esta etapa seleccionó una población definida de oligosacáridos generados durante el procedimiento de hidrólisis. El hidrolizado obtenido anteriormente se ultrafiltró a través de una membrana de 30 kDa de corte (12 volúmenes de diafiltración de tampón acetato 5 mM, pH 6,5) para retirar las cadenas de longitud larga en la fracción retenida.

c) Introducción de un grupo amino primario en el extremo reductor

Se añadió acetato de amonio a la solución de oligosacáridos dimensionados para obtener una concentración final de 300 g/l y se añadió ciano-borohidruro de sodio a una concentración final de 73 g/l. Después de ajustar el pH a $6,5 \pm 0,2$, la mezcla se incubó a 37 °C durante 5 días.

Los amino-oligosacáridos se purificaron después por ultrafiltración a través de una membrana de 3 kDa de corte utilizando 13 volúmenes de NaCl 0,5 M. Esta etapa retiró las cadenas de sacáridos de longitud corta (GP < 6-7) proporcionando un grado final de polimerización promedio de ~15.

La fracción retenida se diafiltró con 4 volúmenes de TAB 10 mM (bromuro de tetrabutilamonio) y después con 7 volúmenes de H₂O para el intercambio de Na⁺ por TAB⁺. El ion orgánico positivo mejoró la solubilidad del sacárido en DMSO (necesario para las siguientes etapas de derivatización) a aproximadamente 10 g/l.

Los oligosacáridos purificados se secaron con un evaporador rotatorio para retirar el agua y después se solubilizaron en DMSO a una concentración de disolvente de aproximadamente 10 g/l.

La solución de amino-oligosacáridos purificada se analizó para determinar el contenido de fósforo mediante el procedimiento de Chen [132] y para determinar la cantidad de grupos amino introducidos mediante el procedimiento de Habbeeb [135].

Como alternativa a la ultrafiltración para retirar los sacáridos de cadena corta, se utilizó una columna de flujo rápido de Q-Sepharose, pero entonces se necesitó un procedimiento de intercambio adicional en una columna SP-Sepharose (Pharmacia™) para efectuar la conversión de Na⁺/TAB⁺.

d) Protección del grupo amino terminal con el reactivo Fmoc

Se hicieron reaccionar los amino-oligosacáridos con Fmoc-OSu (N-9-fluorenilmetoxicarbonilo) (Sigma) de acuerdo con la relación molar -NH₂:Fmoc-OSu = 1:20. La mezcla se incubó durante la noche con agitación a temperatura ambiente y se precipitó con acetona (concentración final del 80 % v/v). El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó varias veces con acetona para retirar el reactivo Fmoc-OSu sin reaccionar.

50

e) Reacción de estabilización con los reactivos DMA y CDI

5 Los amino-oligosacáridos protegidos se solubilizaron en DMSO a 10 g/l y se añadieron a CDI en una relación molar de CDI:fósforo total = 20:1. La mezcla se incubó durante la noche con agitación a temperatura ambiente y se precipitó con acetona (concentración final del 80 % v/v). El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó varias veces con acetona para retirar el reactivo CDI sin reaccionar.

El producto obtenido anteriormente se solubilizó en DMSO a 10 g/l y se añadió a una solución de DMA en etanol (aproximadamente 5,6 M) de acuerdo con la relación molar DMA:fósforo total = 20:1. La mezcla se incubó durante la noche con agitación a temperatura ambiente y se precipitó con acetona (concentración final del 80 % v/v). El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó varias veces con acetona para retirar la DMA sin reaccionar.

10 Los oligosacáridos purificados se secaron después al vacío para retirar las trazas de disolventes orgánicos.

f) Cromatografía de intercambio iónico

15 El oligosacárido seco se solubilizó en agua a 10 g/l y se cargó en una columna de flujo rápido SP-Sepharose (Pharmacia™) equilibrada en NaCl 1 M, con el fin de realizar el intercambio TAB^+/Na^+ . Después, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna (VC) de agua para recuperar trazas de producto adsorbido a la resina. El oligosacárido se secó después con evaporador rotatorio para retirar el agua.

g) Derivatización a éster activo

El producto seco se solubilizó en agua a una concentración de grupos amino 40 mM, después se añadieron 9 volúmenes de DMSO seguidos de TEA (trietilamina) a una concentración final de 200 mM. A la solución resultante, se le añadió N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico (SIDEA) para una concentración final de 480 mM.

20 La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, después el oligosacárido activado se precipitó con acetona (concentración final del 80 % v/v). El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó varias veces con acetona para retirar el SIDEA sin reaccionar.

Los oligosacáridos purificados se secaron después al vacío para retirar el disolvente.

25 La cantidad de grupos éster activos introducidos en la estructura del oligosacárido se determinó mediante un procedimiento colorimétrico como se describe en la referencia 136.

30 Se analizó el oligosacárido activado por RMN 1H como se describió anteriormente para confirmar las modificaciones químicas. Los perfiles de RMN de protón establecidos en experimentos anteriores se utilizaron para evaluar varios lotes de producto. Las señales de sacárido se asignaron mediante la inspección de los espectros de RMN hetero-correlacionados 1D (Figura 9) y 2D (1H , ^{13}C ; Figuras 10A y 10B) y se demostró que eran características de MenA modificado.

Se disolvieron aproximadamente 5 mg de cada muestra en 750 μ l de D_2O y los espectros se registraron en un espectrómetro Bruker Avance a 600 MHz.

La inspección de la relación de los grupos CH_3^{DMA} y $H_1^{anillo\ de\ sacárido}$ proporcionó un rendimiento de la reacción de estabilización de entre el 70 % y el 75 %.

35 El perfil de protones del sacárido modificado se mantuvo y no fueron evidentes modificaciones sustanciales relativas al estado de O-acetilo ni la conformación estructural a partir del análisis de RMN. Sin embargo, los grupos carbamato cambiaron el campo magnético local y por tanto la asignación del espectro de RMN 1H fue complicada.

40 En la Figura 11, se muestran espectros superpuestos de oligosacáridos MenA modificados y nativos. Un desplazamiento descendente de las señales de H_3 , H_4 y H_2 fue evidente debido a que los grupos carbamato en las posiciones C_3 y C_4 del anillo están más cerca que otros núcleos, como por ejemplo H_1 . Los espectros señalan otros desplazamientos, pero su asignación es no es completamente segura.

La Figura 12 muestra que la derivatización química no provocó ningún cambio en el espectro de RMN ^{31}P .

h) Conjugación a CRM₁₉₇

45 Se añadió el oligosacárido activado secado a una solución 45 mg/ml de CRM₁₉₇ en tampón fosfato 10 mM, pH 7,2, de acuerdo con una relación molar de grupos éster:proteína = 12:1. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante la noche y el conjugado obtenido se purificó por ultrafiltración tangencial a través de una membrana de 30 kDa de corte utilizando 50 volúmenes de tampón de fosfato 10 mM, pH 7,2. El producto se esterilizó por filtración y se almacenó a -20 °C hasta la formulación de la vacuna.

50 El conjugado purificado se analizó para determinar el contenido de proteína (ensayo de proteínas microBCA), el contenido de sacárido (determinación colorimétrica de fósforo), el contenido de sacárido libre (análisis

cromatográfico), el perfil de HPLC (en TSKgel G4000SWXL DI de 7,5 mm x 30 cm), el perfil de RMN y el SDS-PAGE.

Estabilidad dependiente del tiempo del conjugado

- 5 La estabilidad del conjugado de CRM₁₉₇ del oligosacárido MenA-CDI-DMA se evaluó mediante el seguimiento de la aparición de sacárido libre en solución, debido a la hidrólisis, durante cuatro semanas de almacenamiento a 37 °C, en comparación a un conjugado de CRM₁₉₇ de oligosacárido de MenA modificado.

El sacárido libre (es decir, no conjugado) se determinó mediante cromatografía de fase inversa en una columna de cartucho ISOLUTE™ C4 (IST™) para aislar las cadenas no conjugadas y después mediante el sacárido permeado por cromatografía HPAE-PAD.

- 10 El sacárido total (es decir, tanto conjugado como no conjugado) se determinó mediante un procedimiento para el análisis cuantitativo de fosfato de N-acetil manosamina, que utiliza cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de amperométrica pulsada (HPAE-PAD) [137].

La relación de sacárido no conjugado a sacárido total se expresó como porcentaje (% de SL).

En un primer experimento, el % de SL se desarrolló de la siguiente manera (Figura 13):

Tiempo (días)	0	7	14	21	28
Modificado	16,8	14,7	23,8	21,7	23,3
Natural	11,0	-	27,0	36,6	39,5

15

En un segundo experimento, los resultados fueron los siguientes (Figura 14):

Tiempo (días)	0	7	14	21	28
Modificado	1,8	1,5	4,2	4,9	8,2
Natural	4,8	5,5	19,3	22,7	28,3

- 20 El oligosacárido conjugado MenA modificado era claramente mucho más resistente a la hidrólisis que su homólogo natural a temperaturas elevadas. Después de 28 días a 37 °C, por ejemplo, el porcentaje de sacárido liberado era del 6,4 % para el oligosacárido modificado frente al 23,5 % para el azúcar natural.

En trabajos adicionales para someter a ensayo la consistencia lote a lote utilizando el sacárido MenA modificado, la aparición de sacárido libre a partir de conjugados se controló durante 8 semanas a 37 °C. Los resultados para tres lotes fueron:

Tiempo (días)	0	7	14	28	56
Lote A	1,7,	2,9	3,2	5,8	8,7
Lote B	1,0	4,2	4,5	6,5	10,9
Lote C	2,2	4,5	5,4	8,2	11,4

- 25 El conjugado modificado era por tanto estable durante un período prolongado. Un nivel de sacárido libre de menos de 12 % estaba bien dentro de los límites aceptables, incluso a temperatura superior a la normal.

Estabilidad dependiente del pH del conjugado

- 30 Se sometió a ensayo la estabilidad de los conjugados de oligosacáridos MenA modificados y no modificados mediante el control de la aparición de sacárido libre a diferentes pH entre 6,0 y 8,0 después de haber estado almacenados a 37 °C durante 28 días. Los oligosacáridos modificados (Lote 5) y no modificados (Lote RS040101) se compararon y los aumentos del sacárido libre ($\Delta\%$ de SL) entre los días 0 y 28 fueron los siguientes (Figura 15):

pH *	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Modificado	10,3	5,4	8,9	8,3	26,1
nativo	43,5	30,1	36,1	20,3	30,5
* pH \pm 0,1					

- 35 El conjugado MenA modificado por tanto mostró una velocidad de reacción de hidrólisis mucho menor que el conjugado del oligosacárido MenA nativo en el intervalo de pH 6,5 a 7,5. A pH 8,0, donde se retiraron los grupos de estabilización del carbamato, el efecto era menos marcado.

Immunogenicidad de conjugados modificados

Los conjugados de CRM₁₉₇ purificada del oligosacárido MenA modificado se utilizaron para inmunizar ratones con el fin de verificar que la modificación no eliminaba la inmunogenicidad del sacárido.

5 La vacuna se formuló para proporcionar una dosis humana única (DHU) de 10 µg de sacárido en un volumen de 0,5 ml. Se fabricaron dos formulaciones: una formulación líquida y una formulación liofilizada. Ambas contenían un adyuvante de fosfato de aluminio a 0,6 mg de Al³⁺/ml en la forma de dosificación final, utilizándose una suspensión acuosa del adyuvante para reconstituir la formulación liofilizada.

La formulación líquida del conjugado de oligosacárido modificado se comparó con la formulación liofilizada del conjugado de oligosacárido nativo (es decir, no modificado).

10 Los ratones se inmunizaron con 1/5 de la DHU, las vacunas se diluyeron con solución salina antes de cada inmunización. Se inyectaron 10 ratones Balb/c (hembras, de 6-8 semanas de edad) por grupo de inmunización por vía subcutánea con 0,5 ml de la vacuna a tiempo cero y después cuatro semanas más tarde. Se realizaron sangrados antes de la primera inmunización y en la semana 6 (sueros pre y post-II), almacenándose los sueros a -70 °C.

15 Títulos anti-polisacárido

Se determinaron los anticuerpos IgG totales anti-polisacáridos MenA específicos en el suero de los animales inmunizados de acuerdo con el procedimiento CDC para el análisis de sueros humanos con MenA [138], adaptado para el análisis de sueros animales, con algunos cambios menores.

20 Cada suero de ratón individual se analizó por duplicado mediante una curva de titulación. Se calculó la MGT para los grupos de inmunización. El título de anti-polisacárido MenA se expresó en Unidades de Elisa en Ratón (UER), utilizándose un software basado en el procedimiento de ensayo de la Línea de Referencia para el cálculo de UER.

25 El análisis de las subclases de IgG se realizó con una mezcla de sueros post-II de los grupos de inmunización, utilizando fosfatasa alcalina-IgG 1 o IgG2a o IgG2b o IgG3 (Zymed) anti-ratón como conjugado secundario en el procedimiento de ELISA. Los títulos se expresaron como DO_{405 nm} obtenida a una dilución 1:3200 de los sueros post-II combinados después de 30 minutos de desarrollo del sustrato.

La Figura 16 muestra los títulos de IgG anti-MenA-pS (MGT) inducidos por los dos lotes de conjugado de MenA modificado (lotes 3 y 5) en comparación con el conjugado de MenA modificado liofilizado (lote 002011) utilizando adyuvante de fosfato de aluminio. Ambos conjugados modificados indujeron un título muy similar al inducido por el conjugado MenA no modificado.

30 La Figura 17 muestra el análisis de subclases de IgG de la mezcla de sueros (diluido a 1:3200) a partir de la inmunización con conjugados de MenA modificados y no modificados. La subclase más representada en todos los sueros era IgG 1, la subclase predominantemente inducida en ratones por antígenos T-dependientes cuando se presentan como proteínas. Debido a que el sacárido capsular MenA es, naturalmente, un antígeno T-independiente que no es capaz de inducir memoria inmunológica, se demostró que la conjugación logró su finalidad.

35 La especificidad del título anti-MenA pS se determinó mediante un ELISA competitivo utilizando MenA pS como competidor a una concentración final de 25 µg/ml. Como se muestra en la Figura 18, hubo muy buena inhibición del título inducido por los conjugados modificados y no modificados, lo que indica que todos los conjugados fueron capaces de inducir títulos anti-MenA específicos de pS.

Ensayo bactericida en suero (EBS) contra *N. meningitidis* del serogrupo A

40 La funcionalidad de los anticuerpos inducidos mediante la inmunización con los conjugados se analizó en un ensayo bactericida *in vitro* para medir la lisis de las bacterias mediada por el complemento.

45 Se utilizaron sueros post-II combinados para cada grupo de inmunización. Se inactivaron durante 30 minutos a 56 °C antes de la utilización en el ensayo. Se utilizó complemento de cría de conejo al 25 % como fuente de complemento (Pel Freeze). El título bactericida se expresó como la dilución de suero recíproca que producía el 50 % de destrucción de las bacterias. Se sometió a ensayo la actividad frente a dos cepas del serogrupo A: F8238 y F6124.

Los títulos fueron los siguientes:

Cepa objetivo	Lote 3	Lote 5	Lote 002011
F8238	2048-4096	2048	4096-8192
F6124	4096	2048	4096

Por tanto, los tres conjugados indujeron buenos títulos bactericidas frente a ambas cepas y los títulos inducidos por los oligosacáridos modificados no fueron significativamente inferiores a los obtenidos utilizando las estructuras de azúcar nativas. Ventajosamente, sin embargo, los oligosacáridos modificados fueron significativamente más estables que los oligosacáridos nativos. Por tanto, la invención proporciona antígenos que conservan el potencial inmunogénico del sacárido capsular nativo MenA, pero que ofrecen una resistencia mejorada a la hidrólisis durante el almacenamiento.

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y que pueden realizarse modificaciones mientras permanezcan dentro del ámbito de la invención.

REFERENCIAS

- 10 [1] Patente de los EE.UU. 4.711.779
 [2] Patente de los EE.UU. 4.761.283
 [3] Patente de los EE.UU. 4.882.317
 [4] Patente de los EE.UU. 4.356.170
 [5] Patente de los EE.UU. 4.695.624
- 15 [6] Nilsson y Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296
 [7] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251): 195-6
 [8] Lindberg (1999) *Vaccine Suppl.* 17 2:S28-36
 [9] Buttery y Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-8
 [10] Ahmad y Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii
- 20 [11] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567
 [12] Documento EP-B-0 477 508
 [13] Patente de los EE.UU. 5.306.492
 [14] Documento WO98/42721
 [15] Dick y col. en *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, 48-114
- 25 [16] *Hermanson Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego CA (1996)
 [17] Bethell G.S. y col., *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 2572-4
 [18] Hearn M.T.W., *J. Chromatogr.*, 1981, 218, 509-18
 [19] *Mol. Immunol.*, 1985, 22, 907-919
 [20] Documento EP-A-0208375
- 30 [21] Documento WO00/10599
 [22] Gever y col., *Med. Microbiol. Immunol*, 165: 171-288 (1979).
 [23] Patente de los EE.UU. 4.057.685.
 [24] Patentes de los EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
 [25] Patente de los EE.UU. 4.459.286.
- 35 [26] Patente de los EE.UU. 4.965.338
 [27] Patente de los EE.UU. 4.663.160.
 [28] Divulgación de investigación, 453077 (enero de 2002)
 [29] Documento EP-A-0372501
 [30] Documento EP-A-0378881
- 40 [31] Documento EP-A-0427347
 [32] Documento WO93/17712
 [33] Documento WO94/03208
 [34] Documento WO98/58668
 [35] Documento EP-A-0471177
- 45 [36] Documento WO00/56360
 [37] Documento WO91/01146
 [38] Documento WO00/61761
 [39] Documento WO01/72337
 [40] Lei y col. (2000) *Dev Biol* (Basel) 103:259-264
- 50 [41] Documento WO00/38711
 [42] Documento WO99/42130
 [43] Documento WO96/40242
 [44] Documento WO00/56365
 [45] Documento WO98/20734
- 55 [46] *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [47] Documento WO90/14837.
 [48] Documento WO00/07621.
 [49] Documento WO99/27960.
- 60 [50] Solicitudes de patentes europeas 0835318, 0735898 y 0761231.
 [51] Krieg (2000) *Vaccine* 19:618-622; Krieg (2001) *Curr opin Mol Ther* 2001 3:15-24; documento WO96/02555, documento WO98/16247, documento WO98/18810, documento WO98/40100, documento WO98/55495, documento WO98/37919 y documento WO98/52581 etc.

- [52] Documento WO99/52549.
 [53] Documento WO01/21207.
 [54] Documento WO01/21152.
 [55] Documento WO00/62800.
 5 [56] Documento WO00/23105.
 [57] Documento WO99/11241.
 [58] Documento WO98/57659.
 [59] Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, número 1.
 [60] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
 10 [61] Solicitud de patente internacional WO00/50078.
 [62] Singh y col. (2001) *J. Cont. Rele.* 70:267-276.
 [63] Solicitud de patente internacional WO 03/007985.
 [64] Covacci y Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
 [65] Documento WO93/18150.
 15 [66] Covacci y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
 [67] Tummmuru y col. (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
 [68] Marchetti y col. (1998) *Vaccine* 16:33-37.
 [69] Telford y col. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
 [70] Evans y col. (1995) *Gene* 153:123-127.
 20 [71] Documento WO96/01272 y documento WO96/01273, especialmente la SEQ ID NO:6.
 [72] Documento WO97/25429.
 [73] Documento WO98/04702.
 [74] Documento WO99/24578.
 [75] Documento WO99/36544.
 25 [76] Documento WO99/57280.
 [77] Documento WO00/22430.
 [78] Tettelin y col. (2000) *Science* 287:1809-1815.
 [79] Documento WO96/29412.
 [80] Pizza y col. (2000) *Science* 287:1816-1820.
 30 [81] Documento WO01/52885.
 [82] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
 [83] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
 [84] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
 [85] Costantino y col. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
 35 [86] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
 [87] Documento Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 [88] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
 [89] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
 [90] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
 40 [91] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
 [92] Gerlich y col. (1990) *Vaccine Supl.* 8:S63-68 y 79-80.
 [93] Hsu y col. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
 [94] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
 [95] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 45 [96] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin y Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 [97] Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19: 1-70.
 [98] Documento WO02/02606.
 [99] Kalman y col. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
 [100] Read y col. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
 50 [101] Shirai y col. (2000) *J. Infect. Dis.* 181 (Supl. 3):S524-S527.
 [102] Documento WO99/27105.
 [103] Documento WO00/27994.
 [104] Documento WO00/37494.
 [105] Documento WO99/28475.
 55 [106] Ross y col. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
 [107] Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
 [108] Zimmerman y Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
 [109] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Supl.:S2-6.
 [110] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* Enero de 1998 16;47(1):12, 19.
 60 [111] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:S101-107.
 [112] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
 [113] Documento WO02/34771.
 [114] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
 [115] Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 65 [116] Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
 [117] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.

- [118] Demicheli y col. (1998) *Vaccine* 16:880-884.
 [119] Stepanov y col. (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.
 [120] Ingram (2001) *Trends Neurosci* 24:305-307.
 [121] Rosenberg (2001) *Nature* 411:380-384.
 5 [122] Moingeon (2001) *Vaccine* 19:1305-1326.
 [123] Robinson y Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
 [124] Donnelly y col. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
 [125] Scott-Taylor y Dagleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
 [126] Apostolopoulos y Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
 10 [127] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
 [128] Dubensky y col. (2000) *Mol Med* 6:723-732.
 [129] Robinson y Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
 [130] Donnelly y col. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S 190-193.
 [131] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
 15 [132] Chen y col., *Anal. Chem.*, 1956, 28, 1756-8.
 [133] Anderson y col., *J. Clin. Invest.*, 1985, 76, 52-9
 [134] Documento Wolfenden R., *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 120, 6814-5
 [135] Habbeeb y col. *Anal. Biochem.* (1966) 14: 328-336
 [136] Miron y Wilchek (1982) *Anal. Biochem.* 126: 433-435
 20 [137] Ricci y col. (2001) *Vaccine* 19:1989-1997.
 [138] Carlone y col. (1992) *J. Clin. Microbiol.* 30:154-159.

REIVINDICACIONES

1. Un sacárido capsular modificado que comprende un grupo de bloqueo en una posición de grupo hidroxilo en al menos una de las unidades de monosacáridos del correspondiente sacárido capsular nativo para su uso como medicamento.
- 5 2. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 1 en el que la al menos una unidad de monosacárido es una unidad de monosacárido no terminal.
3. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 1 o 2 que comprende al menos un grupo amino o grupo hidroxilo libre.
- 10 4. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 3 en el que el al menos un grupo hidroxilo libre es un grupo hidroxilo anomérico terminal.
5. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 1 en el que el grupo de bloqueo es un grupo aceptor de electrones.
6. El sacárido capsular modificado de cualquier reivindicación precedente en el que el grupo de bloqueo es de fórmula:
- 15
$$-O-X-Y \text{ o } -OR^3$$
- en la que
- X es C(O), S(O) o SO₂;
- Y es alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ o aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquiloC₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o Y es NR¹R²;
- 20 R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, o R¹ y R² pueden estar unidos para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂;
- R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, CO₂(alquiloC₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃, o R³ es arilo C₅₋₁₂ o aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados entre F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquiloC₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃;
- 25
7. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 6 en el que el grupo de bloqueo es -OC(O)NR¹R² o -OC(O)CF₃.
8. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 7 en el que el grupo de bloqueo es -OC(O)NR¹R² y R¹ y R² se seleccionan independientemente entre alquilo C₁₋₆.
- 30
9. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 8 en el que R¹ y R² son ambos metilo.
10. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 6 en el que X es C(O).
11. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 6 en el que Y es alquilo C₁₋₁₂.
12. El sacárido capsular modificado de cualquier reivindicación precedente en el que al menos el 10 % de las unidades de monosacáridos comprende un grupo de bloqueo.
- 35
13. El sacárido capsular modificado de cualquier reivindicación precedente, en el que el sacárido capsular correspondiente comprende unidades de monosacáridos unidas por enlaces fosfodiéster.
14. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 13, en el que el sacárido capsular correspondiente es un sacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo A.
- 40
15. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 14 en el que el grupo de bloqueo está en cualquiera de las posiciones 4 y/o 3 del correspondiente sacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo A.
16. El sacárido capsular modificado de la reivindicación 14 en el que el grupo de bloqueo está en cualquiera de las posiciones 4 del correspondiente sacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo A.
17. El sacárido capsular modificado de las reivindicaciones 1 a 16 que es un oligosacárido.
- 45
18. Un procedimiento de preparación del sacárido capsular modificado de las reivindicaciones 1 a 17 que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un sacárido capsular que tenga al menos un grupo hidroxilo en una unidad de monosacárido; y
- (b) convertir dicho al menos un grupo hidroxilo en un grupo de bloqueo.

19. El procedimiento de la reivindicación 18 en el que el grupo de bloqueo es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11.
20. El procedimiento de las reivindicaciones 18 o 19 en el que el grupo de bloqueo es $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$ y la etapa (b) comprende las etapas de:
- 5 (b1) hacer reaccionar el sacárido capsular con un reactivo bifuncional en un disolvente orgánico; y
(b2) hacer reaccionar el producto de la etapa (b1) con un compuesto de amino de fórmula (I):
- $$\text{HNR}^1\text{R}^2 \quad (\text{I})$$
- en la que R^1 y R^2 son como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 y 9.
21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el disolvente orgánico es un disolvente aprótico.
- 10 22. El procedimiento de la reivindicación 21 en el que el disolvente aprótico se selecciona entre dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), formamida, hexametilfosforamida (HMPA), triamida de hexametilfósforo (HMPT), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU) o dimetilacetamida (DMAC).
23. El procedimiento de las reivindicaciones 21 o 22 en el que el disolvente aprótico es DMSO.
- 15 24. El procedimiento de las reivindicaciones 20 a 23 en el que el reactivo bifuncional se selecciona entre 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), carbonil di-1,2,4-triazol (CDT), carbonil di-1,2,3-benzotriazol (CDB), carbonato de difenilo, bromuro de cianógeno, fosgeno o trifosgeno.
25. El procedimiento de la reivindicación 24 en el que el reactivo bifuncional es CDI.
26. El procedimiento de las reivindicaciones 18 a 25 en el que el sacárido capsular modificado es un oligosacárido capsular modificado.
- 20 27. El procedimiento de la reivindicación 26 en el que el sacárido capsular de la etapa (a) es un oligosacárido capsular obtenible mediante el dimensionamiento del correspondiente polisacárido capsular nativo.
28. El procedimiento de la reivindicación 26 en el que el sacárido capsular de la etapa (a) es un polisacárido capsular nativo y el procedimiento comprende adicionalmente una etapa (c) en la que el producto de la etapa (b) se dimensiona, proporcionando de este modo un oligosacárido capsular modificado.
- 25 29. Un procedimiento de preparación del sacárido capsular modificado de las reivindicaciones 1 a 17 que es un procedimiento de síntesis total que comprende la formación de enlaces glucosídicos entre dos o más unidades de monosacáridos.
30. Un sacárido capsular modificado obtenible mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 29.
- 30 31. Un conjugado sacárido-proteína de un sacárido modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 30.
32. El conjugado de la reivindicación 31, en el que la proteína es una toxina o toxoide bacteriano.
33. El conjugado de la reivindicación 32, en el que la toxina o toxoide bacteriano es una toxina o toxoide diftérico.
34. El conjugado de la reivindicación 32, en el que la toxina o toxoide bacteriano es CRM₁₉₇.
- 35 35. Una composición farmacéutica que comprende (a) un sacárido modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 30 y/o un conjugado sacárido-proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34 y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 36. La composición de la reivindicación 35, que comprende adicionalmente un antígeno sacarídico de uno o más de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*, siendo el sacárido opcionalmente un oligosacárido y estando opcionalmente conjugado con una proteína vehículo.
37. La composición de la reivindicación 35 o la reivindicación 36, que comprende adicionalmente un adyuvante de vacuna.
38. La composición de la reivindicación 37, en el que el adyuvante es un fosfato de aluminio.
- 45 39. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38, que es una vacuna contra una enfermedad provocada por *Neisseria meningitidis*.

40. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 39 para generar una respuesta de anticuerpos en un mamífero.
41. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34 para su uso como un medicamento.
- 5 42. El sacárido modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 30, o el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34 para la prevención o el tratamiento de una enfermedad provocada por una o más bacterias encapsuladas.
43. El sacárido modificado o conjugado de la reivindicación 42, en el que la enfermedad es la meningitis bacteriana.

Figura 1

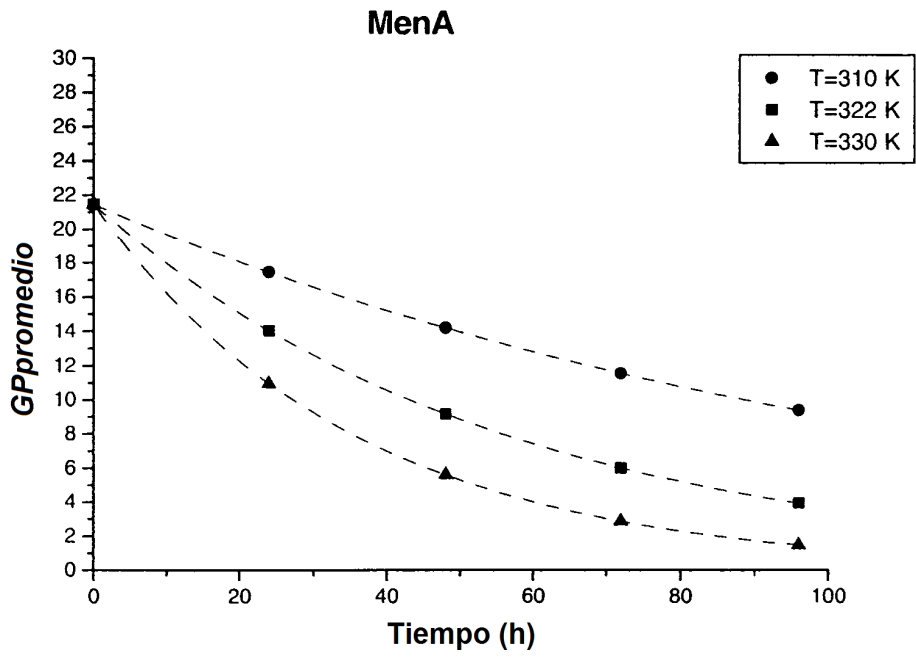


Figura 2

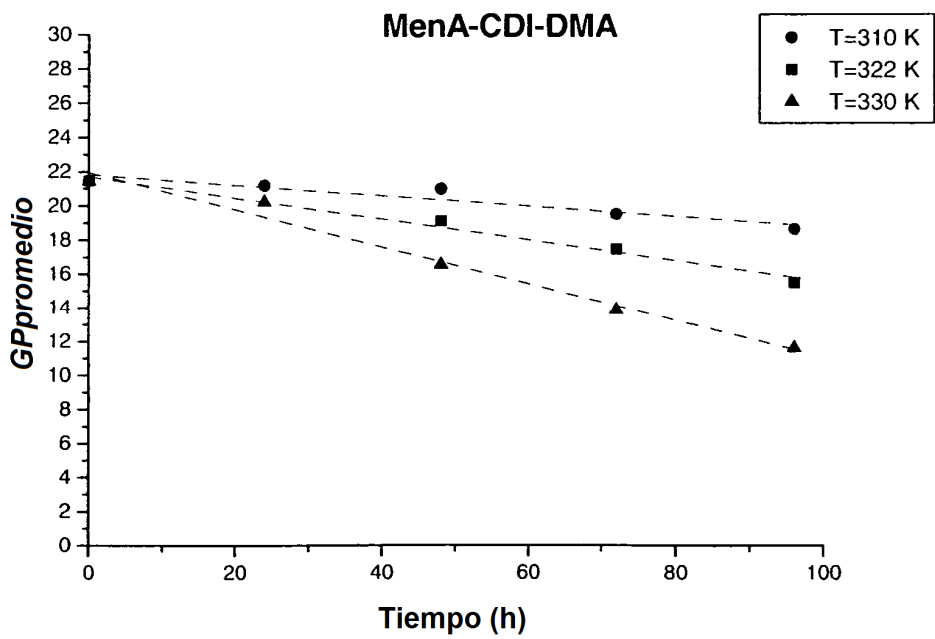


Figura 3

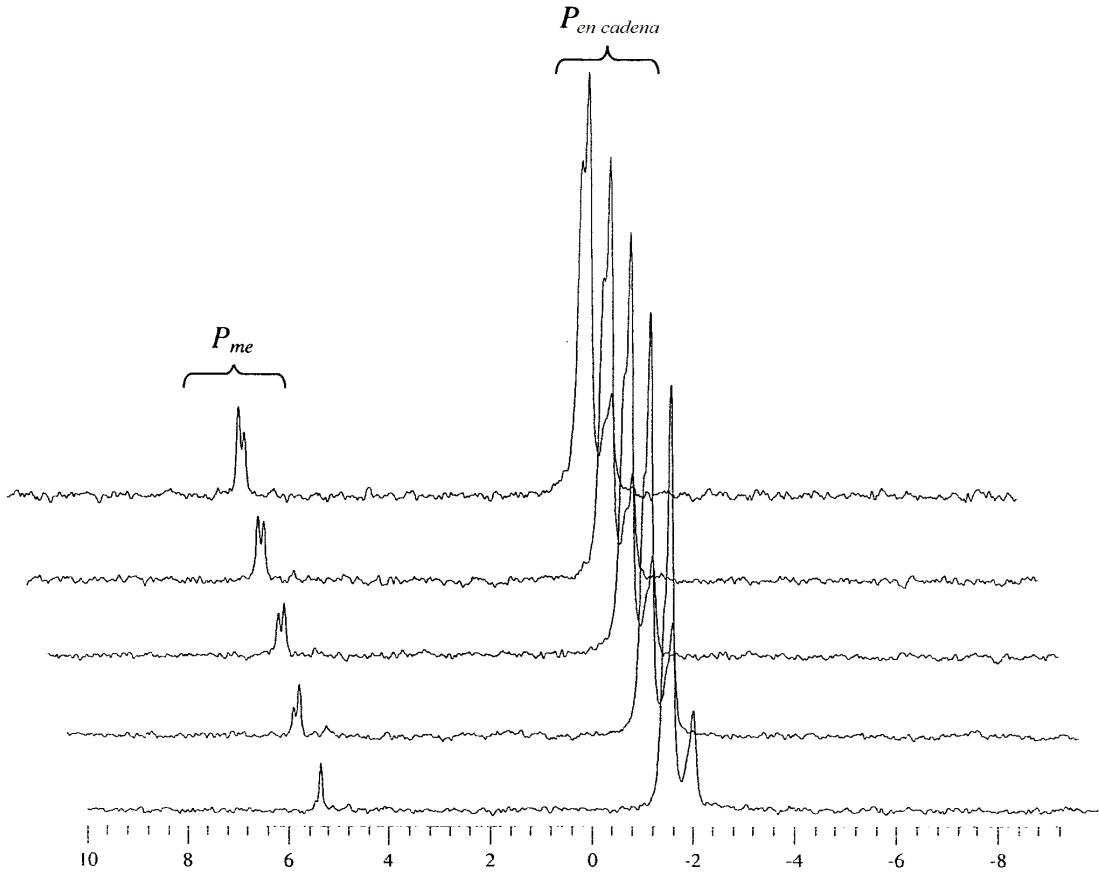


Figura 4

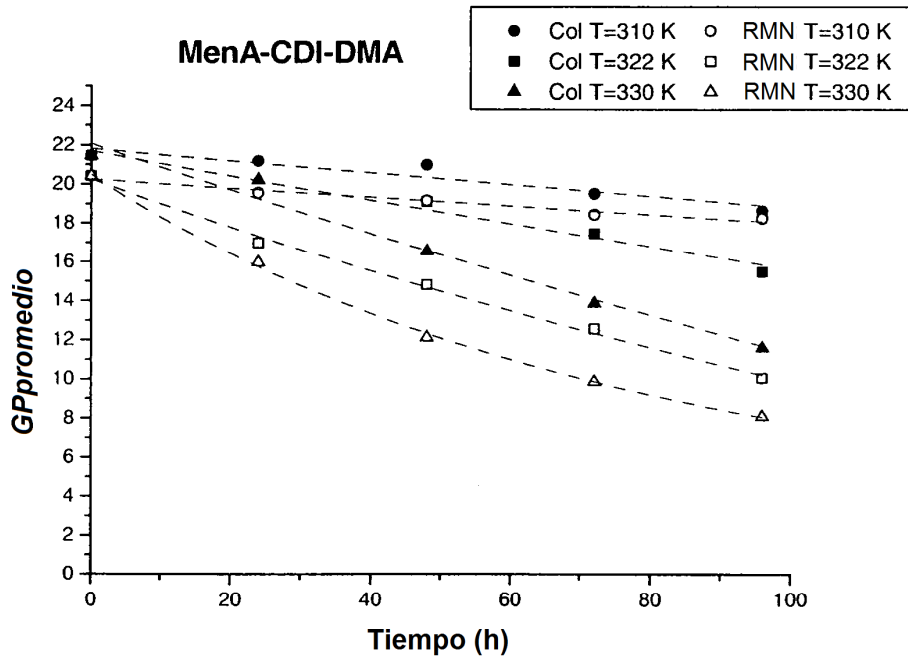


Figura 5

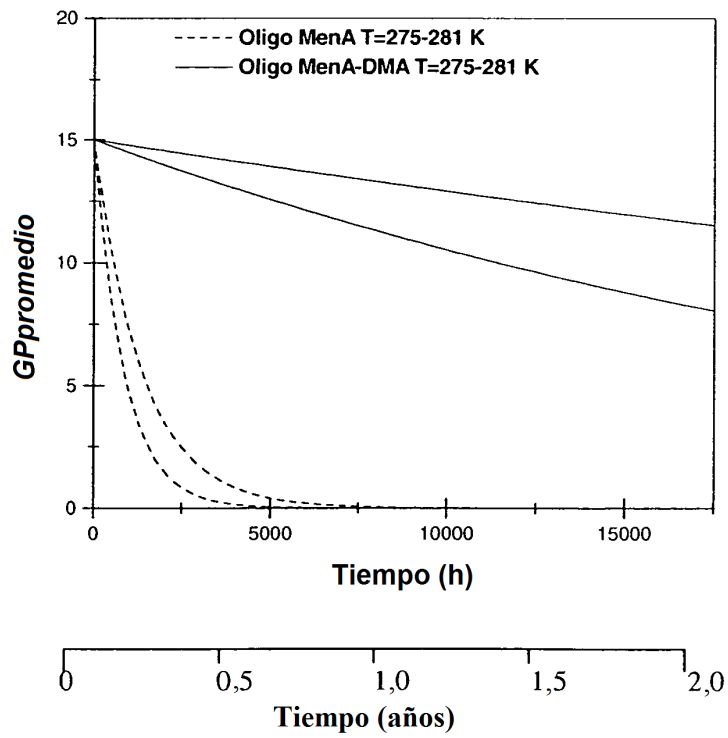


Figura 6

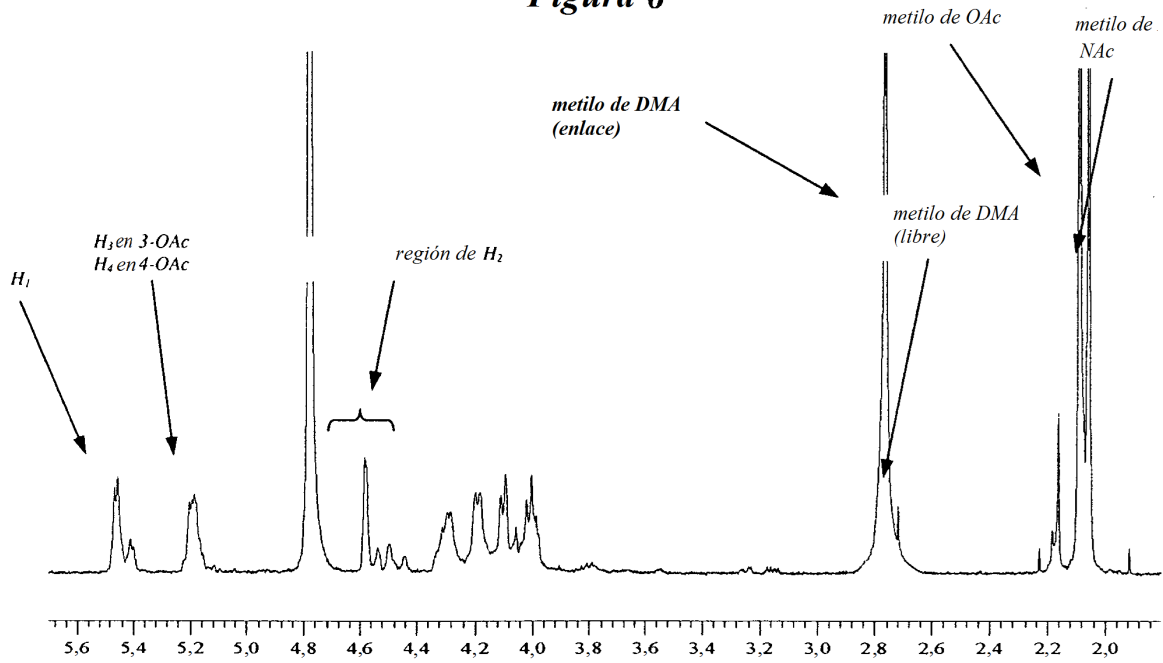


Figura 7

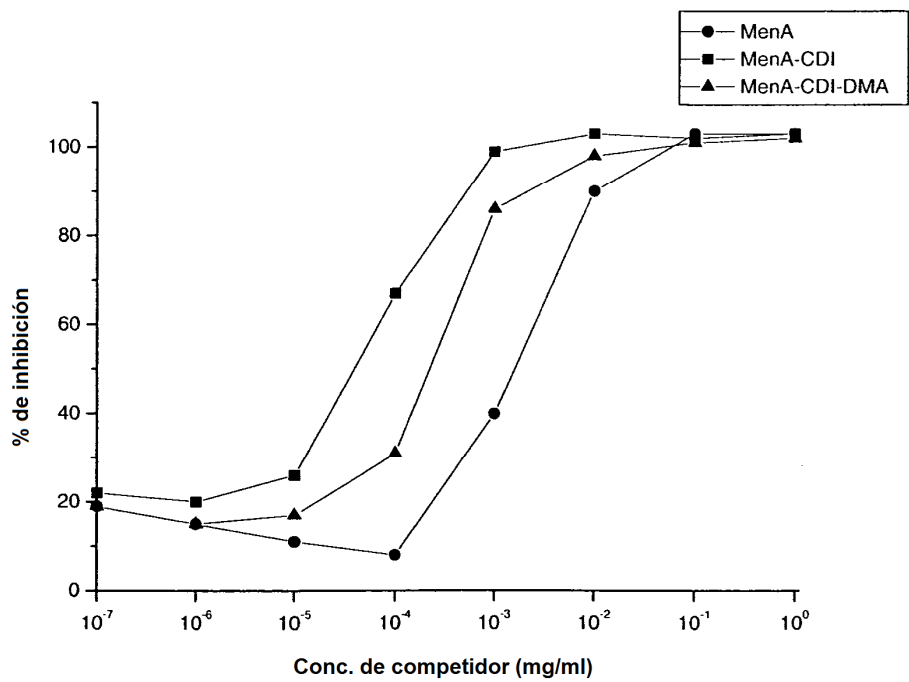


Figura 8

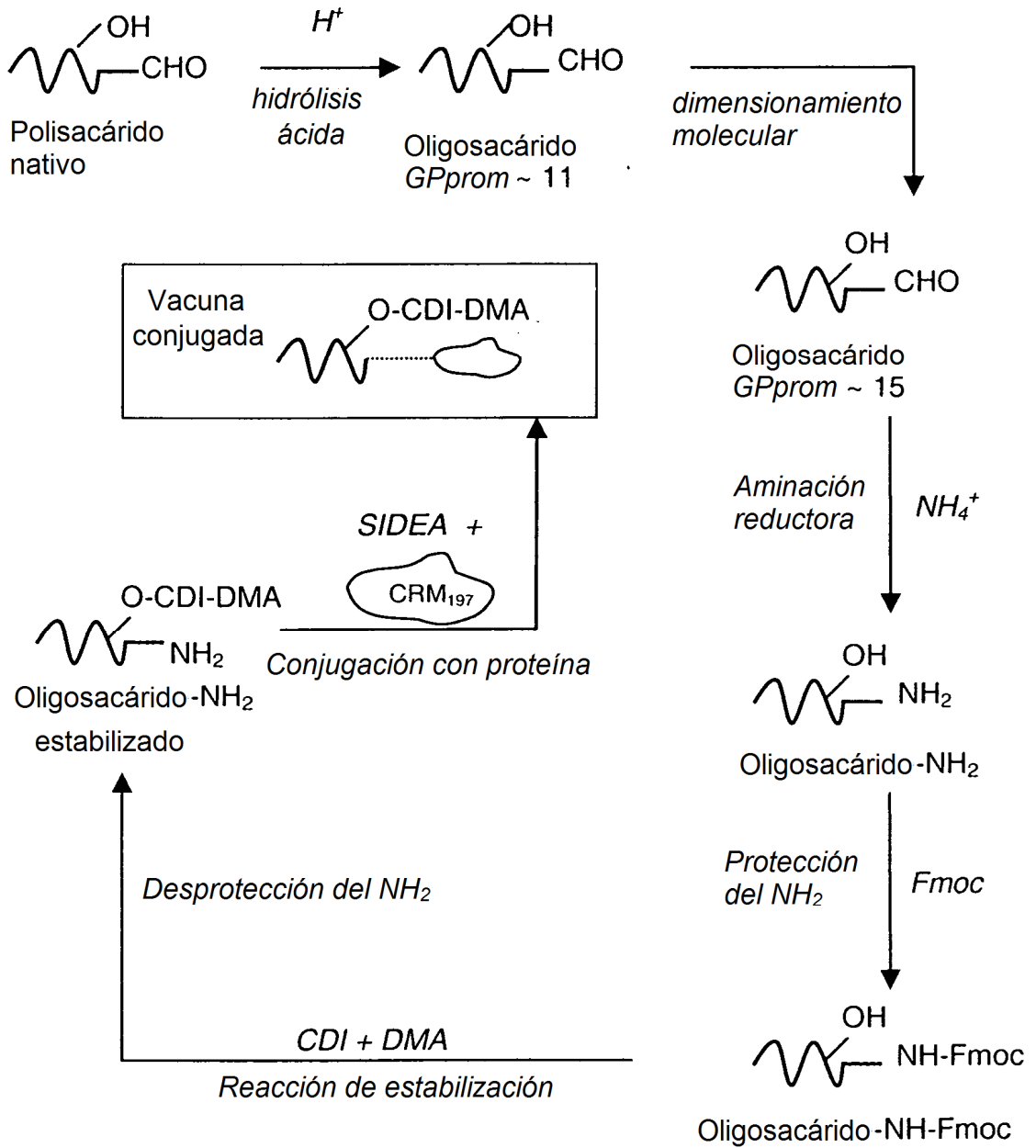


Figura 9

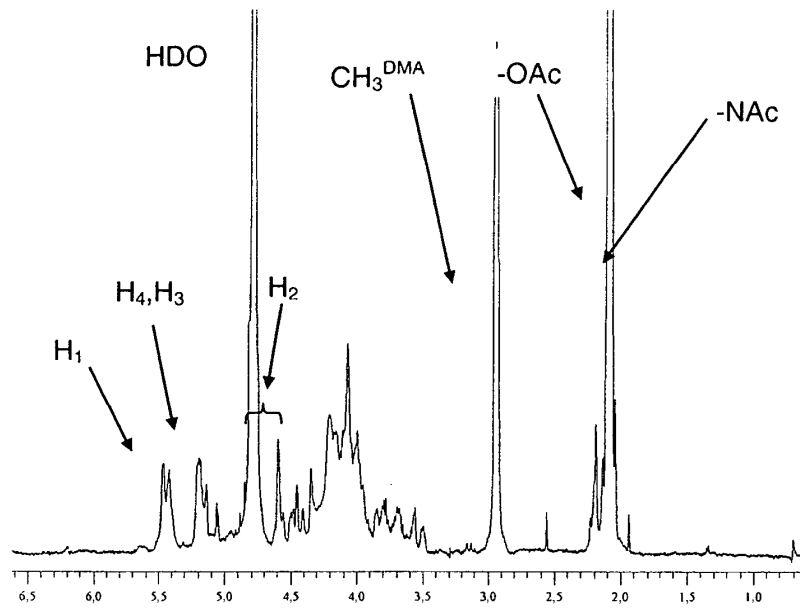


Figura 11

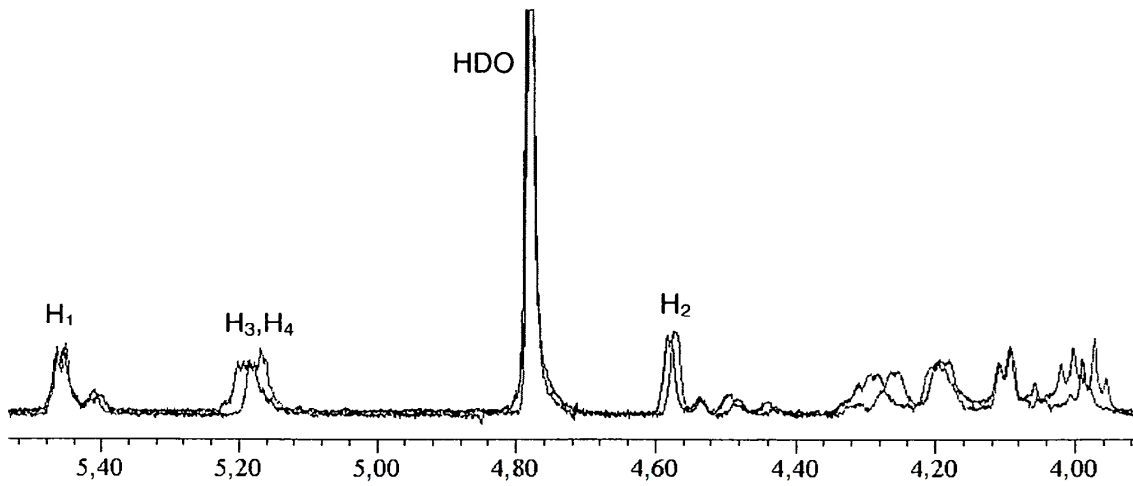


Figura 10A

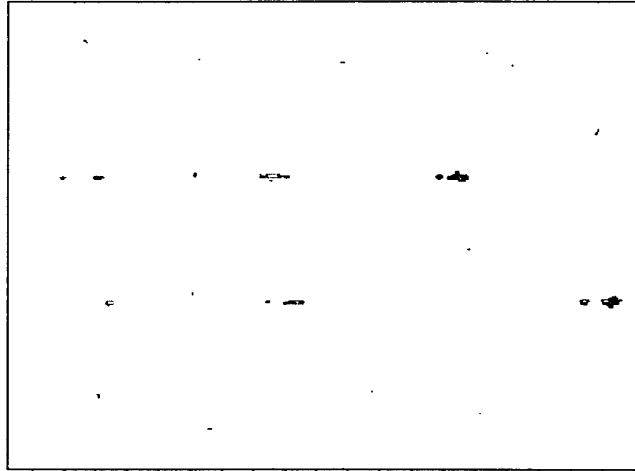


Figura 10B

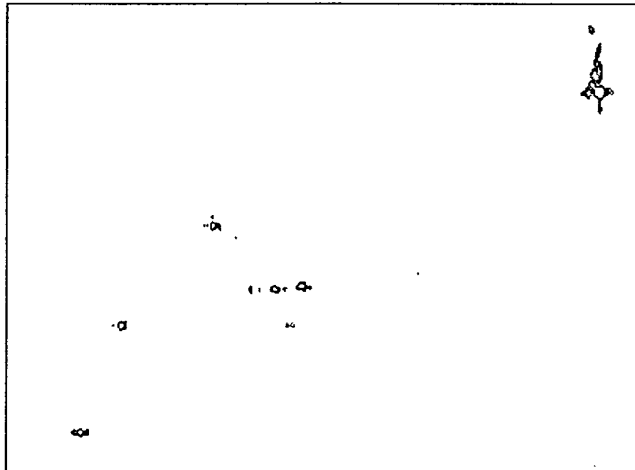


Figura 12

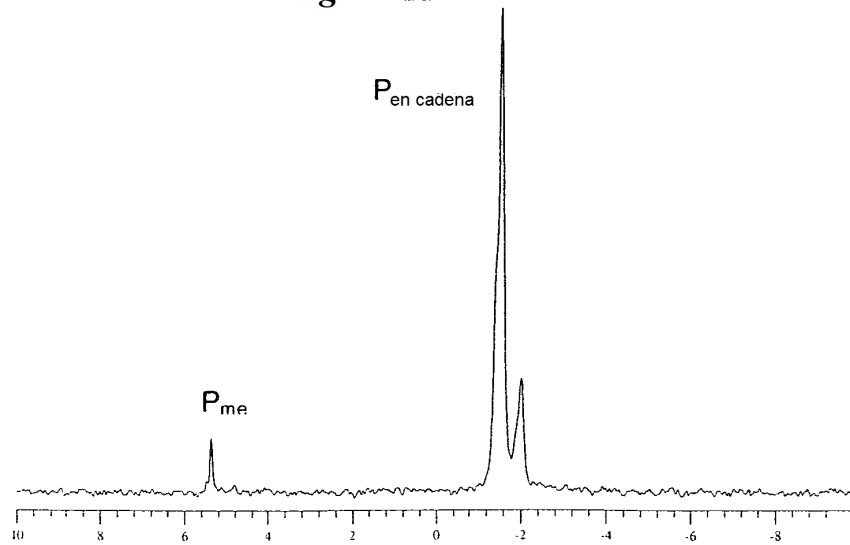


Figura 13

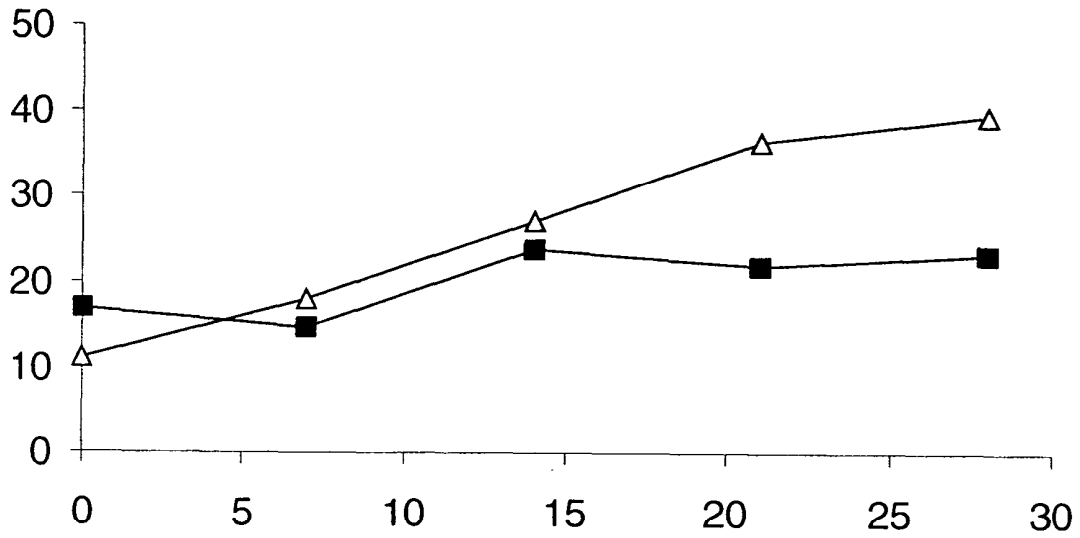


Figura 14

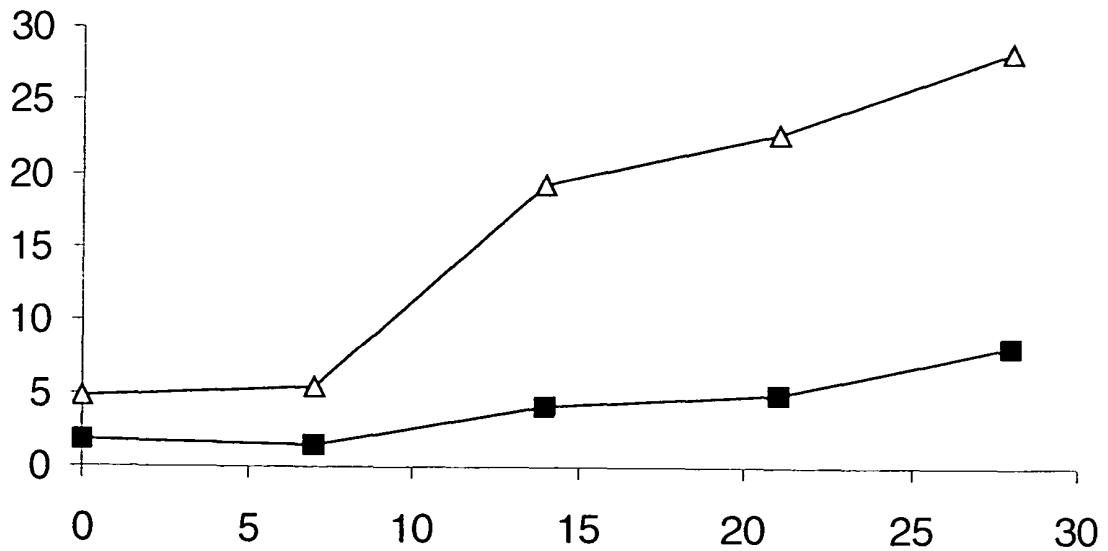


Figura 15

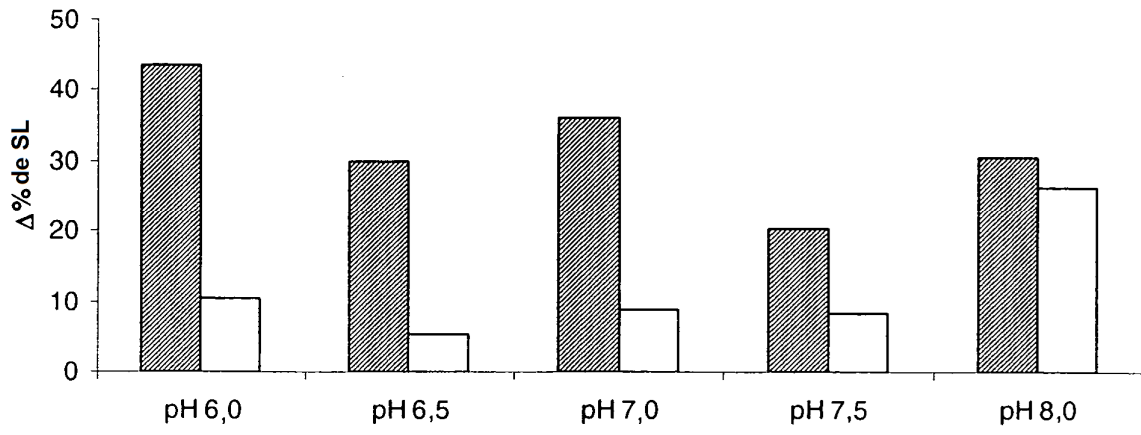


Figura 16

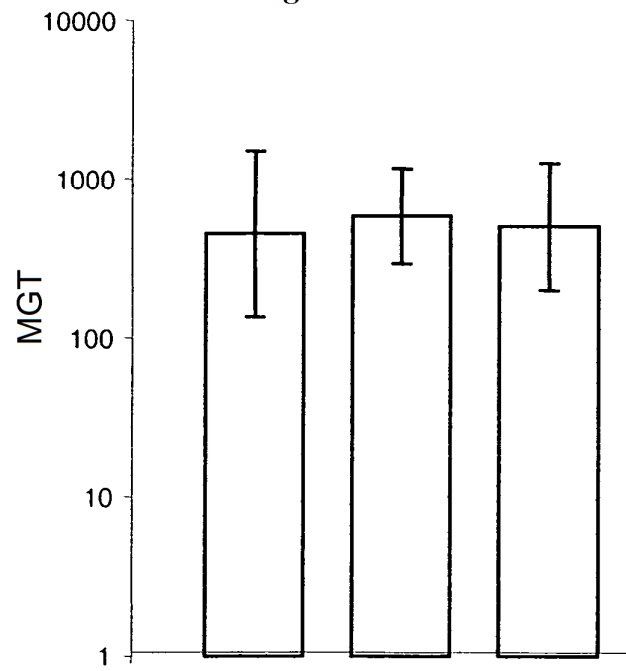


Figura 17

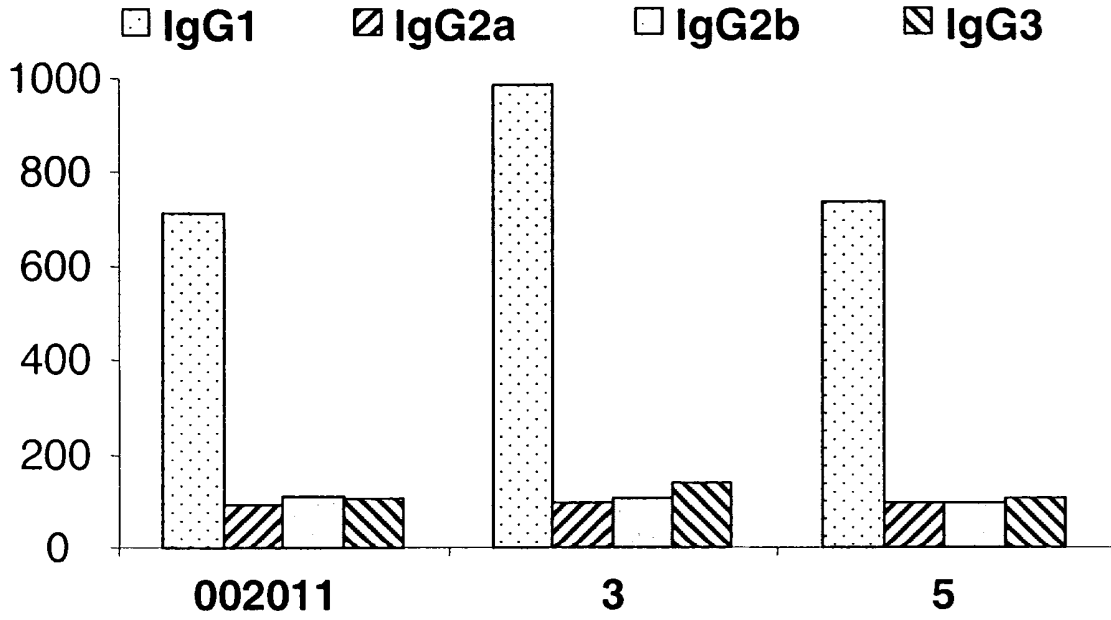


Figura 18

