

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 792**

51 Int. Cl.:  
**C08B 37/00** (2006.01)  
**A61K 39/095** (2006.01)  
**A61K 31/715** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04791697 .8**  
96 Fecha de presentación: **04.10.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1678212**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **Sacáridos capsulares meningocócicos hipo-e hiper-acetilados**

30 Prioridad:  
**02.10.2003 GB 0323103**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.05.2012**

73 Titular/es:  
**Novartis AG**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**COSTANTINO, Paolo y**  
**BERTI, Francesco**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 379 792 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 capsulares meningocócicos hipo- e hiper-acetilados

**Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de los sacáridos capsulares meningocócicos y sus derivados conjugados.

**5 Técnica anterior**

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

- 10 Para potenciar la inmunogenicidad de polisacáridos capsulares, particularmente en niños, se desarrollaron vacunas de conjugado. Éstas comprenden un sacárido capsular conjugado con una proteína portadora [por ejemplo, refs. 1-3]. La conjugación convierte antígenos independientes de T en antígenos dependientes de T.

El sacárido capsular del serogrupo W135 de *Neisseria meningitidis* ("MenW135") comprende un polímero de unidades de disacárido de ácido siálico-galactosa:

- 15  $\rightarrow 4\text{-D-Neup5Ac(7/9OAc)-}\alpha\text{-}(2\rightarrow 6)\text{-D-Gal-}\alpha\text{-}(1\rightarrow$

en la que "Neu" se refiere a ácido neuramínico, comúnmente conocido como ácido siálico.

Similarmente, el sacárido capsular del serogrupo Y de *Neisseria meningitidis* (MenY) comprende un polímero de unidades de disacárido de ácido siálico-glucosa:



- 20 En la naturaleza se ha encontrado que estos sacáridos capsulares están O-acetilados en alguna de las posiciones 7 y 9 de algunos de los residuos de ácido siálico. La O-acetilación del sacárido W135 se "informó por primera vez" en la referencia 4, informándose de la O-acetilación en las posiciones O-7 y O-9. También se observó la acetilación en las posiciones O-7 y O-9 para el sacárido del serogrupo Y, aunque los autores observaron que el trabajo previo había indicado O-acetilación en las posiciones O-7, O'-3 o O'-4. Otros estudios sobre el contenido de O-acetilo de los sacáridos se informaron en la referencia 5.

- 25 La referencia 5 informa que "hay un cuerpo creciente de evidencia de que la O-acetilación no es importante para provocar una respuesta de anticuerpos protectores" para el serogrupo W135. A diferencia, la referencia 6 informa de que hay "evidencia de que la O-acetilación afecta la inmunogenicidad de vacunas de polisacáridos". Sin embargo, con la idea de que "la O-acetilación del CPS [polisacárido capsular] puede no ser importante en provocar inmunidad protectora", los autores de la referencia 5 investigaron la acetilación en los serogrupos W135 y Y. Entre sus resultados no se observó cambio en la O-acetilación para estos dos serogrupos después del almacenamiento en condiciones básicas durante 9 días a temperatura ambiente.

- 30 La referencia 7 informó de que "el estado de O-acetilación de las cepas W135 y Y" usadas en vacunas de polisacárido tetravalentes "no se había informado" previamente. Los autores continuaron informando en la referencia 8 que "se sabe poco sobre el estado de O-acetilación de los serogrupos W135 y Y", y establecieron que más trabajo "puede proporcionar percepciones útiles en la formulación de vacunas óptimas", aunque no se elaboraron la naturaleza de tal trabajo adicional y las posibles percepciones. La referencia 9 informa de que la "relevancia de la O-acetilación para el desarrollo de vacunas sigue siendo incierta" para el serogrupo W135. La referencia 6 está de acuerdo con que los datos "sobre el impacto de la O-acetilación sobre la inmunogenicidad de los polisacáridos de los serogrupos W-135 o Y no están todavía disponibles" (enero de 2004).

- 35 Esta confusión y la falta de información sobre los serogrupos W135 y Y contrasta con los otros dos serogrupos para los que las vacunas de sacárido están actualmente en uso. Se ha informado ampliamente de la variación en la O-acetilación del polisacárido capsular del serogrupo C de *Neisseria meningitidis* [10, 11], pero no parece tener ningún impacto negativo sobre la inmunogenicidad, ya que los productos Menjugate™ y NeisVac-C™ son ambos eficaces. A diferencia, la des-O-acetilación del polisacárido del serogrupo A se ha asociado a una "espectacular reducción en la inmunogenicidad" [12].

- 40 Un objeto de la invención es proporcionar derivados de sacáridos capsulares que puedan usarse para preparar composiciones inmunogénicas, particularmente cuando se conjuguen con proteínas portadoras, y particularmente para los serogrupos W135 y Y meningocócicos.

50

**Divulgación de la invención**

A pesar de la incertidumbre referente a la función de la O-acetilación en vacunas para los serogrupos W135 y Y meningocócicos, los inventores han encontrado que la O-acetilación puede ser de hecho relevante, particularmente durante la preparación de vacunas de conjugado. La invención se basa en el descubrimiento de que los sacáridos capsulares modificados derivados de MenW135 y MenY que tienen niveles de O-acetilación alterados en las posiciones 7 y 9 de los residuos de ácido siálico pueden usarse para preparar composiciones inmunogénicas. Con respecto a los sacáridos nativos sin modificar, los derivados de la invención se seleccionan preferencialmente durante la conjugación con proteínas portadoras. Además, los conjugados de estos derivados muestran inmunogenicidad mejorada en comparación con polisacáridos nativos.

**10 Sacáridos modificados**

Por tanto, la invención proporciona un sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135 modificado según la reivindicación 1. Similarmente, la invención proporciona un sacárido capsular meningocócico del serogrupo Y modificado según la reivindicación 2.

**Sacáridos de la invención**

Más generalmente, la invención proporciona un sacárido capsular meningocócico modificado conjugado con una proteína portadora en el que el sacárido comprende  $n$  o más unidades de repetición de la unidad de disacárido { [ácido siálico] - [hexosa] } en la que la hexosa es tanto galactosa como glucosa y  $n$  es un número entero de 1 a 100, y en la que (a)  $x\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 7; y/o (b) si la hexosa es galactosa,  $y\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 9, y si la hexosa es glucosa,  $y\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 9.

El valor de  $x$  es entre 2-9.

El valor de  $y$  es entre 35-55.

Preferentemente,  $x > m$ , en la que  $m$  se selecciona de: 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

Preferentemente, el ácido siálico es ácido N-acetilneuramínico.

Si la hexosa es galactosa, la unidad de disacárido { [ácido siálico] - [hexosa] } es preferentemente:



Si la hexosa es glucosa, la unidad de disacárido { [ácido siálico] - [hexosa] } es preferentemente:



El sacárido capsular meningocócico modificado está conjugado con una proteína portadora. En tales conjugados: (i) entre el 2-9%, preferentemente entre el 4-8%, más preferentemente entre el 5-7%, incluso más preferentemente aproximadamente el 6% de los residuos de ácido siálico están O-acetilados en la posición 7; (ii) entre el 35-55%, preferentemente entre el 40-50%, más preferentemente entre el 42-46%, incluso más preferentemente aproximadamente el 43% (si la hexosa es Gal) o aproximadamente el 45% (si la hexosa es Glc) de los residuos de ácido siálico están O-acetilados en la posición 9.

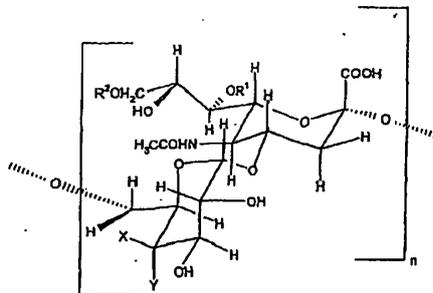
La invención también proporciona una composición que comprende  $a$  moléculas de sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135 en las que el número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de sacárido capsular es  $b$ , y en la que: (a)  $x\%$  de los  $a \cdot b$  residuos de ácido siálico del serogrupo W135 en la composición están O-acetilados en la posición 7; y/o (b)  $y\%$  de los  $a \cdot b$  residuos de ácido siálico del serogrupo W135 en la composición están O-acetilados en la posición 9, y en la que  $x$  y  $y$  son como se definen anteriormente.

La invención también proporciona una composición que comprende  $a$  moléculas de sacárido capsular meningocócico del serogrupo Y en las que el número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de sacárido capsular es  $b$ , y en la que: (a)  $\leq x\%$  de los  $a \cdot b$  residuos de ácido siálico del serogrupo Y en la composición están O-acetilados en la posición 7; y/o (b)  $y\%$  de los  $a \cdot b$  residuos de ácido siálico del serogrupo Y en la composición están O-acetilados en la posición 9, y en la que  $x$  y  $y$  son como se definen anteriormente.

Los sacáridos en dichas poblaciones pueden conjugarse con vehículos de proteínas y/o estar libres en disolución. Preferentemente, los sacáridos o conjugados de la invención están en una forma purificada, por ejemplo, sustancialmente en ausencia de polisacárido nativo.

**Representaciones estructurales**

La presente invención también proporciona un sacárido conjugado con una proteína portadora que comprende n o más repeticiones de la siguiente unidad de disacárido:



5 en la que:

- n es un número entero de 1 a 100,
- X y Y son grupos diferentes seleccionados de -H y -OH,
- R<sup>1</sup> se selecciona independientemente de -H y -COCH<sub>3</sub> y pueden ser iguales o diferentes en cada unidad de disacárido,
- 10 - R<sup>2</sup> se selecciona independientemente de -H y -COCH<sub>3</sub> y pueden ser iguales o diferentes en cada unidad de disacárido, y si
  - X es -OH y Y es -H, (a) x% de R<sup>1</sup> son -COCH<sub>3</sub> y/o (b) y% de R<sup>2</sup> son -COCH<sub>3</sub>.
  - X es -H y Y es -OH, (a) x% de R<sup>1</sup> son -COCH<sub>3</sub> y/o (b) y% de R<sup>2</sup> son -COCH<sub>3</sub>.

Preferentemente,  $x > m$ , en la que m es como se define anteriormente.

15 Los sacáridos están conjugados con una proteína portadora.

Si el sacárido está conjugado con una proteína portadora y X es -OH y Y es -H: (a) X es 2-10, preferentemente aproximadamente 4-8, más preferentemente aproximadamente 5-7, incluso más preferentemente aproximadamente 6 y/o (b) y es 35-55, preferentemente aproximadamente 40-50, más preferentemente aproximadamente 42-44, incluso más preferentemente aproximadamente 43.

20 Si el sacárido está conjugado con una proteína portadora y X es -H y Y es -OH: (a) X es 2-9, preferentemente aproximadamente 4-8, más preferentemente aproximadamente 5-7, incluso más preferentemente aproximadamente 6 y/o (b) y es 35-55, preferentemente aproximadamente 40-50, más preferentemente aproximadamente 42-46, incluso más preferentemente aproximadamente 45.

25 El estado de O-acetilación de los residuos de ácido siálico en las posiciones 7 y 9 en sacáridos y conjugados de la invención puede medirse usando RMN de protón 1D y 2D como se describe más adelante. Puede usarse HPAEC para medir la O-acetilación total, pero no puede distinguir entre diferentes posiciones [234]. La EM por pulverización iónica se ha usado para analizar la O-acetilación en MenA [235].

**Procedimiento para preparar un sacárido modificado**

30 La invención también proporciona un procedimiento para preparar un conjugado inmunogénico que comprende las etapas de: (1) proporcionar un sacárido capsular meningocócico de partida y una proteína portadora, estando cualquiera de los dos o ambos opcionalmente modificados para volverse reactivo(s) contra el (os) otro(s); (2) formar un enlace covalente entre el sacárido y la proteína portadora; y (3) purificar los glicoconjugados resultantes, aumentando entre las etapas (1) y (3) (por ejemplo, durante la etapa de reacción (2)) el grado de O-acetilación en la posición 9 de residuos de ácido siálico en el sacárido de partida al 35-55%.

35 El sacárido capsular meningocócico es del serogrupo W135 o Y.

**Materiales de partida de sacáridos capsulares**

40 Los sacáridos capsulares modificados de la invención son obtenibles a partir de los sacáridos encontrados en la cápsula de los serogrupos W135 o Y de *N. meningitidis*. Por tanto, los sacáridos de la invención son preferentemente sacáridos del serogrupo W135 de *N. meningitidis* modificados y sacáridos del serogrupo Y de *N. meningitidis* modificados.

Los polisacáridos capsulares meningocócicos se preparan normalmente mediante un procedimiento que comprende las etapas de precipitación de polisacáridos (por ejemplo, usando un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción con fenol frío (para eliminar proteína) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) [por ejemplo, ref. 13].

Un procedimiento más preferido [14] implica la precipitación de polisacáridos seguida de solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol inferior. La precipitación puede lograrse usando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y de cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro), o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. El bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB') es particularmente preferido [15]. La solubilización del material precipitado puede lograrse usando un alcohol inferior tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc., pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar complejos de CTAB-polisacárido. El etanol se añade preferentemente al polisacárido precipitado para dar una concentración final (basada en el contenido total de etanol y agua) de entre el 50% y el 95%.

Después de la re-solubilización, el polisacárido puede tratarse adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en la que no sea aceptable una contaminación incluso mínima (por ejemplo, para la producción de vacunas humanas). Esto implicará normalmente una o más etapas de filtración, por ejemplo, filtración profunda, puede usarse filtración a través de carbono activo, filtración por tamaño y/o ultrafiltración. Una vez filtrado para eliminar los contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para el tratamiento y/o procesamiento posterior. Esto puede conseguirse convenientemente intercambiando cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

Los sacáridos de la invención pueden ser polisacáridos u oligosacáridos. Los oligosacáridos tienen un grado de polimerización inferior al encontrado en polisacáridos nativos capsulares presentes en bacterias.

La invención usa preferentemente oligosacáridos. Éstos tienen preferentemente un grado de polimerización promedio inferior a 30, por ejemplo, entre 15 y 25, preferentemente aproximadamente 15-20. El grado de polimerización puede medirse convenientemente por cromatografía de intercambio iónico o por ensayos colorimétricos [16].

Los oligosacáridos se forman convenientemente por fragmentación del polisacárido capsular purificado (por ejemplo, mediante hidrólisis, por tratamiento suave con ácido, mediante calentamiento, etc.), que irá normalmente seguido de purificación de los fragmentos del tamaño deseado. Si se realiza la hidrólisis, el hidrolizado se dimensionará generalmente con el fin de eliminar oligosacáridos de longitud corta. Esto puede lograrse de diversas formas tales como ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a aproximadamente 4 se eliminan preferentemente para los serogrupos W135 y Y.

Como una alternativa a la purificación de fuentes nativas, los sacáridos capsulares (y los oligosacáridos en particular) pueden obtenerse por síntesis total o parcial, por ejemplo, la síntesis de Hib se desvela en la ref. 17, y la síntesis de MenA en la ref. 18.

### **Conjugación covalente**

Los sacáridos modificados de la invención puede someterse a cualquier procesamiento aguas abajo usual que se aplique a sacáridos (por ejemplo, derivatización, conjugación, fragmentación, etc.). Para potenciar la inmunogenicidad, los sacáridos modificados de la invención se conjugan con una proteína portadora: la conjugación con proteínas portadoras es particularmente útil para vacunas pediátricas [19] y es una técnica muy conocida [por ejemplo, se revisa en la refs. 20 a 28, etc.].

Por tanto, la invención proporciona un conjugado de una proteína portadora y un sacárido de la invención.

Las proteínas portadoras preferidas son toxinas bacterianas o toxoides tales como toxoide diftérico o toxoide tetánico. Se prefiere particularmente el derivado CRM<sub>197</sub> de la toxina de la difteria [29-31]. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [32], péptidos sintéticos [33, 34], proteínas de choque térmico [35, 36], proteínas de *Pertussis* [37, 38], citocinas [39], linfocinas [39], hormonas [39], factores de crecimiento [39], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopes de linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos de diversos antígenos derivados de patógenos [40] tales como la proteína N19 [41], proteína D de *H. influenzae* [42, 43], proteína pneumocócica de la superficie PspA [44], pneumolisina [45], proteínas de captación de hierro [46], toxina A o B de *C. difficile* [47], toxinas bacterianas mutantes (por ejemplo, toxina del cólera 'CT' o toxina lábil al calor de *E. coli* 'LT') tales como una CT con una sustitución en Glu-29 [48], etc. Vehículos preferidos son toxoide diftérico, toxoide tetánico, proteína D de *H. influenzae* y CRM<sub>197</sub>.

Dentro de una composición de la invención es posible usar más de una proteína portadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de la supresión de vehículo. Por tanto, pueden usarse diferentes proteínas portadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo W135 podrían conjugarse con CRM<sub>197</sub> mientras que los sacáridos del serogrupo Y podrían conjugarse con toxoide tetánico. También es posible usar más de una proteína portadora para un antígeno de sacárido particular, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo Y podrían estar en dos grupos, con algunos conjugados con CRM<sub>197</sub> y otros conjugados con toxoide tetánico. Sin embargo, en general se prefiere usar la misma proteína portadora para todos los serogrupos, siendo CRM<sub>197</sub> la elección preferida.

Una proteína portadora individual podría llevar más de un antígeno de sacárido [49]. Por ejemplo, una proteína portadora individual podría haberse conjugado con sacáridos de los serogrupos W135 y Y. Sin embargo, en general

se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo.

Se prefieren conjugados con una relación de sacárido:vehículo (peso/peso) de entre 1:5 (es decir, proteína en exceso) y 5:1 (es decir, sacárido en exceso). Se prefieren las relaciones entre 1:2 y 5:1, ya que las relaciones entre 1:1,25 y 1:2,5 son más preferidas. La relación puede ser aproximadamente 1,1 para conjugados MenW135 y 0,7 para conjugados MenY. Basándose en una cantidad de 10 µg de sacárido MenW135 o MenY, los conjugados preferidos comprenden 6,6-20 µg de vehículo CRM<sub>197</sub>.

Los conjugados pueden usarse conjuntamente con proteína portadora libre [50]. Si una proteína portadora dada está presente tanto en forma libre como conjugada en una composición de la invención, la forma sin conjugar es preferentemente no más del 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición como un todo, y más preferentemente está presente a menos del 2% en peso.

Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada con cualquier ligador adecuado cuando sea necesario.

El sacárido se activará o funcionalizará normalmente antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos cianilantes tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio [51, 52, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 26.

Los enlaces mediante un grupo ligador pueden hacerse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 3 y 53. Un tipo de enlace implica aminación reductora del polisacárido, acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo ligador de ácido adípico y luego acoplamiento de una proteína al extremo del grupo ligador de ácido adípico [24, 54, 55]. Un tipo de enlace preferido es un ligador de carbonilo que puede formarse haciendo reaccionar un grupo hidroxilo libre del sacárido modificado con CDI [56, 57] seguido de reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otro tipo de enlace preferido es un ligador de ácido adípico que puede formarse acoplando un grupo -NH<sub>2</sub> libre en el sacárido modificado con ácido adípico (usando, por ejemplo, activación con diimida) y luego acoplando una proteína con el producto intermedio de sacárido-ácido adípico resultante [24, 54, 58]. Otro tipo de enlace preferido puede formarse haciendo reaccionar un grupo hidroxilo libre de un sacárido con un agente cianilante (por ejemplo, p-nitrofenilcianato, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio (CDAP), tetrafluoroborato de N-cianotrietilamonio (CTEA)), seguido de reacción con un grupo amina en la proteína (opcionalmente mediante un espaciador, por ejemplo, una hidracina) [59, 60]. Otros ligadores incluyen B-propionamido [61], nitrofenil-etilamina [62], haluros de haloacilo [63], enlaces glucosídicos [2, 64], ácido 6-aminocaproico [65], ADH [66], restos C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> [67], etc. Como una alternativa a usar un ligador puede usarse enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido, seguida de aminación reductora con la proteína, como se describe en, por ejemplo, las referencias 2 y 68.

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

Se prefiere un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, sustituyendo grupos =O terminales con -NH<sub>2</sub>), seguido de derivatización con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimidodiestéer de ácido adípico) y reacción con proteína portadora. Otra reacción preferida usa activación con CDAP con un vehículo de proteína D.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados pueden separarse. Hay muchos procedimientos adecuados que incluyen cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las refs. 69 y 70, etc.].

Si la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, se prefiere que la preparación del oligosacárido preceda a la conjugación.

#### **Composiciones farmacéuticas**

La invención proporciona una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) que comprende (a) un sacárido capsular modificado conjugado de la invención, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las vacunas basadas en sacáridos o conjugados de sacárido-proteína son muy conocidas en la técnica, incluyendo conjugados basados en sacáridos des-O-acetilados (NeisVac-C™). Las vacunas de la invención pueden ser tanto profilácticas (es decir, para prevenir la infección) como terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas.

'Vehículos farmacéuticamente aceptables' incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición farmacéutica. Vehículos adecuados son macromoléculas normalmente grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trehalosa [71], agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivos. Tales vehículos son muy

conocidos para aquellos expertos 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 de tamponamiento del pH y similares. Una discusión exhaustiva de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 72.

5 Normalmente, las composiciones farmacéuticas se preparan como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas para potenciar el efecto adyuvante. La administración directa de las composiciones farmacéuticas será generalmente parenteral (por ejemplo, mediante inyección, tanto subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente como intramuscularmente, o administrada al espacio intersticial de un tejido). Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse a una lesión. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, rectal (supositorios) y administraciones transdérmicas o transcutáneas [por ejemplo, ref. 73], agujas e hipoesprays.

10 El pH de la composición está preferentemente entre 6 y 8, preferentemente aproximadamente 7. Puede mantenerse pH estable usando un tampón. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [74]. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

15 Las composiciones de la invención pueden estar en forma acuosa (es decir, disoluciones o suspensiones) o en forma seca (por ejemplo, polvos liofilizados). La formulación líquida permite que las composiciones se administren directamente de su forma envasada sin la necesidad de reconstitución en un medio acuoso y, por tanto, son ideales para inyección. Tales composiciones pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringuillas precargadas. Las jeringuillas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringuilla incluirá una dosis única de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis única o múltiples dosis.

20 Las composiciones líquidas de la invención también son adecuadas para reconstituir otras vacunas de una forma liofilizada, por ejemplo, para reconstituir antígenos de Hib o DTP liofilizados. Si una composición de la invención va a usarse para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit, que puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringuilla precargada y un vial, usándose el contenido de la jeringuilla para reactivar el contenido del vial antes de la inyección.

25 Las composiciones secas de la invención ofrecen estabilidad durante el almacenamiento, pero deben reconstituirse en forma líquida antes de la administración. La invención proporciona un kit que comprende un primer recipiente que contiene una composición seca de la invención y un segundo recipiente que contiene una composición acuosa para reconstituir el contenido del primer recipiente. La composición acuosa en el segundo recipiente puede contener antígenos (por ejemplo, no meningocócicos), o puede contener sólo excipientes. El primer recipiente será generalmente un vial; el segundo recipiente también puede ser un vial, o puede ser una jeringuilla precargada.

30 Para preparar composiciones secas pueden usarse estabilizadores, por ejemplo, disacáridos tales como trehalosa y sacarosa, o alcoholes de azúcar tales como manitol. Estos componentes se añadirán antes de la liofilización y aparecerán en la composición reconstituida.

35 Otros componentes de composiciones incluyen: cloruro sódico (para tonicidad), por ejemplo, a aproximadamente 9 mg/ml; detergente, por ejemplo, Tween (polisorbato), tal como Tween 80, generalmente a bajos niveles, por ejemplo, <0,01%; y sales tampón, por ejemplo, un tampón fosfato. La composición puede incluir un agente antibiótico.

40 Las composiciones de la invención pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de múltiples dosis. Para formas de múltiples dosis líquidas se prefieren los viales a las jeringuillas precargadas. Las dosis eficaces pueden establecerse rutinariamente, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

45 Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden un cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), además de cualquier otro componente, según se necesite. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz' se indica que la administración de esa cantidad a un individuo, tanto en una dosis única 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 va a tratarse, edad, el grupo taxonómico del individuo que va a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseada, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico práctico de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente ancho que puede determinarse por ensayos rutinarios.

50 Una cantidad típica de cada antígeno de sacárido meningocócico por dosis es entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, o aproximadamente 10 µg (expresados como sacárido).

Cada sacárido puede estar presente a sustancialmente la misma cantidad por dosis. Sin embargo, puede preferirse un exceso de sacárido MenY, por ejemplo, una relación de MenY:MenW135 (peso/peso) de 1,5:1 o más.

Si un conjugado está presente, una composición también puede comprender proteína portadora libre [50]. Preferentemente, la proteína portadora libre está presente a menos del 5% en peso de la composición; más preferentemente está presente a menos del 2% en peso.

Las composiciones de la invención incluirán generalmente uno o más adyuvantes. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a:

#### A. Composiciones que contienen minerales

Composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la ref. 75], o mezclas de diferentes compuestos minerales con los compuestos, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [76].

#### B. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua tales como MF59 [Capítulo 10 de la ref. 75; véase también la ref. 77] (escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5%, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). También puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

#### C. Formulaciones de saponinas [capítulo 22 de la ref. 75]

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la ref. 78. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol [79].

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 75]. Los ISCOM también incluyen normalmente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las refs. 79-81. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergente adicional [82].

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponinas puede encontrarse en las refs. 83 y 84.

#### D. Viroomas y partículas similares a virus

Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas víricos nativos. Las proteínas víricas pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tal como HA o NA), virus de la hepatitis B (tal como proteínas de núcleo o de cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la glosopeda, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q $\beta$  (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Los VLP se tratan adicionalmente en las refs. 85-90. Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, la ref. 91.

#### E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de “partícula pequeña” preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en la ref. 92. Tales “partículas pequeñas” de 3dMPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  [92].  
 5 Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529 [93, 94].

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en las refs. 95 y 96.

10 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina sin metilar ligada por un enlace fosfato a una guanosina). También se ha mostrado que los ARN bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimuladores.

15 Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 97, 98 y 99 desvelan posibles sustituciones análogas, por ejemplo, sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-deazaguanosina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en las refs. 100-105.

20 La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [106]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1 tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en las refs. 107-109. Preferentemente, el CpG es el ODN CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar “inmunómeros”. Véanse, por ejemplo, las refs. 106 y 110-112.

25 Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina lábil al calor de *E. coli* “LT”), cólera (“CT”) o *Pertussis* (“PT”). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 113 y como adyuvantes parenterales en la ref. 114. La toxina o el toxoide están preferentemente en forma de una holotoxina que comprende tanto subunidades A como B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferentemente la subunidad B no está mutada.  
 30 Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las refs. 115-122. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en la ref. 123.

### 35 *F. Inmunomoduladores humanos*

Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.) [124], interferones (por ejemplo, interferón  $\gamma$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral.

### *G. Bioadhesivos y mucoadhesivos*

40 También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [125] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención [126].

### *H. Micropartículas*

45 Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150  $\mu\text{m}$  de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30  $\mu\text{m}$  de diámetro, y lo más preferentemente ~500 nm a ~10  $\mu\text{m}$  de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), un ácido polihidroxi-búterico, un poliorioéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico tal como CTAB).  
 50

*I. Liposomas (capítulos 13 y 14 de la ref. 75)*

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en las refs. 127-129.

*J. Formulaciones de polioxietiléneteres y polioxietilénesteres*

- 5 Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen polioxietiléneteres y polioxietilénesteres [130]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol [131], además de tensioactivos de polioxietilentalquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [132]. Los polioxietiléneteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

*K. Polifosfaceno (PCPP)*

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las refs. 133 y 134.

*L. Muramilpéptidos*

- 15 Ejemplos de muramilpéptidos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (MTP-PE).

*M. Compuestos de imidazoquinolona*

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen imiquimod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descrito adicionalmente en las refs. 135 y 136.

- 20 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvante pueden usarse en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [137]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [138]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [139]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [140]; (6) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80™ al 0,4%, polímero de bloque de Pluronic al 5% L121 y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula; (7) sistema de adyuvante Ribi™ (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 está constituido por monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado de LPS no tóxico (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan de agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 75.

- 35 Las sales de aluminio y el fosfato de calcio son adyuvantes parenterales preferidos. Las toxinas mutantes son adyuvantes de la mucosa preferidos.

Se prefieren composiciones de la invención que incluyen un adyuvante de fosfato de aluminio. El hidróxido de aluminio está preferentemente ausente. Puede incluirse adyuvante de fosfato de aluminio a aproximadamente 0,6 mg de Al<sup>3+</sup> por ml.

**Combinaciones de inmunógenos**

- 40 Las composiciones de la invención pueden comprender tanto un sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135 modificado de la invención como un sacárido capsular meningocócico del serogrupo Y modificado de la invención.

- 45 Otros antígenos también pueden incluirse en las composiciones de la invención. Por tanto, la invención proporciona una composición que comprende un sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135 modificado de la invención y/o un sacárido capsular meningocócico del serogrupo Y modificado de la invención, y que comprende además uno o más antígenos seleccionados de la siguiente lista:

- un antígeno de sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*.
- un antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*.
- un antígeno de proteína del serogrupo B de *N. meningitidis* tal como aquellos en las refs. 141 a 150.
- 50 - preparaciones de microvesículas del serogrupo B de *N. meningitidis* [151], 'OMV nativos' [152], ampollas o vesículas de la membrana externa [por ejemplo, refs. 153 a 158, etc.]. Éstas pueden prepararse a partir de

- bacterias que han sido genéticamente manipuladas [159-162], por ejemplo, para aumentar la inmunogenicidad (por ejemplo, expresan en exceso inmunógenos), para reducir la toxicidad, para inhibir la síntesis de polisacáridos capsulares, para regular por defecto la expresión de PorA, etc. Pueden prepararse a partir de cepas hiperampollosas [163-166]. Pueden incluirse vesículas de una *Neisseria* no patógena [167]. Las OMV pueden prepararse sin el uso de detergentes [168, 169]. Pueden expresar proteínas de no *Neisseria* sobre su superficie [170]. Pueden estar agotadas en LPS. Pueden mezclarse con antígenos recombinantes [153, 171]. Pueden usarse vesículas de bacterias con diferentes subtipos de proteínas de la membrana externa de clase I, por ejemplo, seis subtipos diferentes [172, 173] usando dos poblaciones de vesículas diferentes genéticamente manipuladas que muestran cada una tres subtipos, o nueve subtipos diferentes usando tres poblaciones de vesículas diferentes genéticamente manipuladas que muestran cada una tres subtipos, etc. Subtipos útiles incluyen: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1; P1.18-1,3,6.
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae B* [por ejemplo, 174].
  - un antígeno de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 208, 209, 210].
  - 15 - un antígeno del virus de la hepatitis A tal como virus inactivado [por ejemplo, 175, 176].
  - un antígeno del virus de la hepatitis B tal como los antígenos de la superficie y/o del núcleo [por ejemplo, 176, 177].
  - un antígeno de *Bordetella pertussis* tal como la holotoxina de *Pertussis* (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, refs. 178 y 179]. Pueden usarse antígenos de *Pertussis* celulares.
  - 20 - un antígeno diftérico tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 3 de la ref. 180], por ejemplo, el mutante CRM<sub>197</sub> [por ejemplo, 181].
  - un antígeno tetánico tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de la ref. 180].
  - antígeno(s) de la poliomielitis [por ejemplo, 182, 183] tales como IPV.

25 Los antígenos de proteínas tóxicas pueden desintoxicarse, si es necesario (por ejemplo, desintoxicación de toxina de *Pertussis* por medios químicos y/o genéticos [179]).

Si se incluye un antígeno diftérico en la composición farmacéutica también se prefiere incluir un antígeno tetánico y antígenos de *Pertussis*. Similarmente, si se incluye un antígeno tetánico también se prefiere incluir antígenos diftéricos y de *Pertussis*. Similarmente, si se incluye un antígeno de *Pertussis* también se prefiere incluir antígenos diftéricos y tetánicos.

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

Los antígenos están preferentemente adsorbidos a un adyuvante de sal de aluminio.

35 Como una alternativa a usar antígenos de proteínas en la composición farmacéutica de la invención puede usarse ácido nucleico que codifica el antígeno [por ejemplo, refs. 184 a 192]. Por tanto, los componentes de proteína de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden sustituirse con ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica la proteína. Similarmente, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que imitan antígenos de sacárido, por ejemplo, mimótopes [193] o anticuerpos antiidiotípicos.

40 Éstos pueden sustituir componentes de sacarina individuales o pueden complementarlos. Como un ejemplo, la vacuna puede comprender un peptidomimético del polisacárido capsular MenC [194] o MenA [195] en lugar del propio sacárido.

#### *Vacunas de meningococos combinadas*

45 Las composiciones preferidas de la invención comprenden un sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135 modificado de la invención, un sacárido capsular meningocócico del serogrupo Y modificado de la invención y un sacárido capsular del serogrupo C en las que los sacáridos capsulares están conjugados con proteínas portadoras. La composición también puede incluir un sacárido capsular del serogrupo A, preferentemente conjugado con una proteína portadora. Los sacáridos en estas composiciones son preferentemente oligosacáridos. Los conjugados de oligosacáridos pueden prepararse como se desvela en la referencia 14.

50 Los sacáridos del serogrupo A pueden ser O-acetilados o des-O-acetilados. Los sacáridos del serogrupo C pueden ser O-acetilados o des-O-acetilados.

Los conjugados de MenC preferidos incluyen, basándose en 10 µg de sacárido, 12,5-25 µg de vehículo CRM<sub>197</sub>. Los conjugados de MenA preferidos incluyen, basándose en 10 µg de sacárido, 12,5-33 µg de vehículo CRM<sub>197</sub>.

55 Las dosis típicas para conjugados de MenC y MenA son las mismas que para MenW135 y MenY, es decir, entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, o aproximadamente 10 µg.

Las relaciones preferidas (peso/peso) para los sacáridos de los serogrupos C:W135:Y son: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1;

4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1; y 2:1:1. Las relaciones preferidas para los sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1. Se prefiere usar una masa sustancialmente igual de cada sacárido por dosis.

5 Si una composición incluye un sacárido del serogrupo A, puede prepararse reconstituyendo el sacárido del serogrupo A a partir de una forma liofilizada usando una composición acuosa que comprende uno o más de los sacáridos del serogrupo C, W135 y/o Y.

10 Si una composición incluye un sacárido del serogrupo A, puede ser un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo en el sacárido nativo han sido sustituidos con un grupo de bloqueo [196]. Esta modificación mejora la resistencia a la hidrólisis. Se prefiere que todas o sustancialmente todas las unidades de monosacárido puedan tener sustituciones de grupos de bloqueo.

15 Además de incluir antígenos de sacáridos de los serogrupos Y, W135 y C (y, opcionalmente, A), las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos del serogrupo B. A diferencia de los serogrupos A, C, W135 y Y, el sacárido capsular de MenB es inadecuado para su uso como un inmunógeno en seres humanos debido a su similitud con los propios antígenos. Por tanto, si va a usarse un antígeno de sacárido para MenB, es necesario usar un sacárido modificado tal como uno en el que los grupos N-acetilo en los residuos de ácido siálico del sacárido están sustituidos por grupos N-acilo. Grupos N-acilo adecuados son grupos acilo C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub> tales como N-propionilo [197]. Sin embargo, en vez de usar un antígeno de sacárido, se prefiere usar un antígeno de polipéptido.

20 Por tanto, la composición puede incluir uno o más antígenos de polipéptido que inducen una respuesta inmunitaria que protege contra infección por MenB. Más generalmente, la composición puede inducir después de la administración a un sujeto una respuesta de anticuerpos en el sujeto que es bactericida contra dos o más (por ejemplo, 2 ó 3) linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3 del serogrupo B de *N. meningitidis*.

25 Se ha publicado la secuencia del genoma del serogrupo B de *N. meningitidis* [148] y pueden seleccionarse antígenos adecuados de los polipéptidos codificados [150]. Ejemplos de antígenos se desvelan en la referencias 141 a 150. Composiciones preferidas incluyen uno o más de los cinco siguientes antígenos [198]: (1) una proteína 'NadA', preferentemente en forma oligomérica (por ejemplo, en forma trímera); (2) una proteína '741'; (3) una proteína '936'; (4) una proteína '953'; y (5) una proteína '287'.

Las secuencias prototipo para estas cinco proteínas se encuentran en la referencia 143 del siguiente modo:

Proteína	NadA	741	936	953	287
SEC ID N°	2943 y 2944	2535 y 2536	2883 y 2884	2917 y 2918	3103 y 3104

30 Si se usa en composiciones de la invención, la proteína del serogrupo B puede comprender la secuencia de aminoácidos de una de estas secuencias prototipo, o puede comprender una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con la secuencia prototipo; y/o (b) comprende un fragmento de al menos *n* aminoácidos consecutivos de la secuencia prototipo, en la que *n* es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos para (b) carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o el extremo N de la secuencia prototipo. Otros fragmentos preferidos comprenden un epítipo de la secuencia.

40 Estos cinco antígenos de MenB pueden estar presentes en la composición como cinco proteínas separadas, pero se prefiere que al menos dos de los antígenos se expresen como una única cadena de polipéptidos (una proteína 'híbrida' [refs. 145-147]), es decir, de forma que los cinco antígenos formen menos de cinco polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas principales: primera, una proteína que puede ser inestable o que se expresa débilmente por sí misma puede ayudarse añadiendo un componente híbrido adecuado que venza el problema; segundo, la preparación comercial es simplificada ya que sólo necesita emplearse una expresión y purificación con el fin de producir dos proteínas útiles por separado. Una proteína híbrida incluida en una composición de la invención puede comprender dos o más (es decir, 2, 3, 4 ó 5) de los cinco antígenos básicos. Se prefieren los híbridos que consisten en dos de los cinco antígenos, por ejemplo, aquellos que comprenden: NadA y 741; NadA y 936; NadA y 953; NadA y 287; 741 y 936; 741 y 953; 741 y 287; 936 y 953; 936 y 287; 953 y 287.

Tres antígenos de MenB preferidos para la inclusión combinada en composiciones de la invención son:

NadA de la cepa 2996 con delección del extremo C y péptido conductor procesado

ATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVNTLTKTVNENKQNVDAK  
VKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATNALNKLGENITTFEAETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDE  
TNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADV  
YTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTIVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQYPYVNG

Híbrido 287-953

MASPDVKSADTLSKPAAPVSEKETEAKEDAPQAGSQGQAPSZQGGQDMAAVSEENTGNGGAAATDKPKNEDEGAQNDMPQNA  
ADTDSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAGESEQANQPDMAANTADGMQGGDPSAGGENAGNTAAQGTNQAENNOTAGSQNPASS  
TNPSATNSGGDFGRTNVGNVVIDGPSQNTLTHCKGSDSCGNFLDEEVQLKSEFEKLSADDKISNYKKDGNKNDKDFVGL  
VADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNRYLTYGAEK  
LPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFFHTENGRSPSRGRFAAKVDFGSKSVGDIIDSGDGLHMGTKQFKAAIDGNF  
KGTWTENGGDVSQKGYFYPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGFGVFAGKKEQDGGGGGATYKVDYEHANARFAIDHFNSTNVGGF  
YGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQHFTDHLKSADIFDAAQYDIFRVSTKFNFNKGLVSVGDNLTMHGKTAPVKL  
KAEKFNCYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVLYLVNVMGKTSVRIDIQIEAAKQ\*

Híbrido 936-741

MVSAVIGSAAVGAKSVDRTTGAQTDNVMALRIETTARSYLQRONNQTKGYTPQISVVGYNRHLGLLQGVATEGEKQFVGVQIA  
RSEQAAEVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVVMGILTPEEQAIITQKVSTTVGVQ  
KVITLYQNYVQRGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAETKTYGNGDSLNTGKLNKDKV  
SRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFOQEIQDSEHSKGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEPGRATYRGTAF  
GSDDAGGKLYTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVK  
TVNGIRHIGLAAKQ\*

5 Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones de la invención que incluyen antígenos de MenB pueden inducir preferentemente una respuesta de anticuerpos bactericidas en suero que es eficaz contra dos o tres de los linajes hipervirulentos de MenB A4, ET-5 y el linaje 3. Adicionalmente pueden inducir respuestas de anticuerpos bactericidas contra uno o más de los linajes hipervirulentos subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o complejo de ET-37, y contra otros linajes, por ejemplo, linajes hiperinvasivos. Estas respuestas de anticuerpos se miden convenientemente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [por ejemplo, véase la nota a pie de página 14 de la referencia 150]. La composición no necesita inducir anticuerpos bactericidas contra todas y cada una de las cepas de MenB dentro de estos linajes hipervirulentos; más bien, para un grupo dado de cuatro o 10 más cepas de los meningococos del serogrupo B dentro de un linaje hipervirulento particular, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra al menos el 50% (por ejemplo, el 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos preferidos de cepas incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. El suero tiene preferentemente un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo, 2<sup>10</sup>, 2<sup>11</sup>, 2<sup>12</sup>, 2<sup>13</sup>, 2<sup>14</sup>, 2<sup>15</sup>, 2<sup>16</sup>, 2<sup>17</sup>, 2<sup>18</sup> o superior, preferentemente al menos 2<sup>14</sup>), es decir, el suero puede 15 destruir al menos el 50% de las bacterias de prueba de una cepa particular si se diluye 1/1024, como se describe en la referencia 150. Las composiciones preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las siguientes cepas de meningococos del serogrupo B: (i) del agrupamiento A4, cepa 961-5945 (B:2b:P1.21,16) y/o cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo de ET-5, cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) y/o cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) del linaje 3, cepa 394/98 (B:4:P1.4) y/o cepa BZ198 (B:NT:-). Las composiciones más preferidas pueden inducir respuestas bactericidas 20 contra las cepas 961-5945, 44/76 y 394/98. Las cepas 961-5945 y G2136 son ambas cepas de referencia de *Neisseria* MLST [identificaciones 638 y 1002 en la ref. 199]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (por ejemplo, ATCC BAA-335) y era la cepa secuenciada en la referencia 148. La cepa 44/76 se ha usado y caracterizado ampliamente (por ejemplo, ref. 200) y es una de las cepas de referencia de *Neisseria* MLST [identificación 237 en la ref. 199; fila 32 de la tabla 2 en la ref. 201]. La cepa 394/98 se aisló originariamente en 25 Nueva Zelanda en 1998, y ha habido varios estudios publicados usando esta cepa (por ejemplo, refs. 202 y 203). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia de MST [identificación 409 en la ref. 199; fila 41 de la tabla 2 en la ref. 201]. La composición puede inducir adicionalmente una respuesta bactericida contra la cepa LNP17592 del serogrupo W135 (W135:2a:P1.5,2) del complejo de ET-37. Ésta es una cepa Hajji aislada en Francia de 2000.

30 Otros antígenos de polipéptidos de MenB que pueden incluirse en composiciones de la invención incluyen aquellos que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEC ID N°: 650 de la ref. 141; SEC ID N°: 878 de la ref. 141; SEC ID N°: 884 de la ref. 141; SEC ID N°: 4 de la ref. 142; SEC ID N°: 598 de la ref. 143; SEC ID N°: 818 de la ref. 143; SEC ID N°: 864 de la ref. 143; SEC ID N°: 866 de la ref. 143; SEC ID N°: 1196 de la ref. 143; SEC ID N°: 1272 de la ref. 143; SEC ID N°: 1274 de la ref. 143; SEC ID N°: 1640 de la ref. 143; SEC ID N°: 1788 de la ref. 143; SEC ID N°: 2288 de la ref. 143; SEC ID N°: 2466 de la ref. 143; SEC ID N°: 2554 de la ref. 143; SEC ID N°: 2576 de la ref. 143; SEC ID N°: 2606 de la ref. 143; SEC ID N°: 2608 de la ref. 143; SEC ID N°: 2616 de la ref. 143; SEC ID N°: 2668 de la ref. 143; SEC ID N°: 2780 de la ref. 143; SEC ID N°: 2932 de la ref. 143; SEC ID N°: 2958 de la ref. 143; SEC ID N°: 2970 de la ref. 143; SEC ID N°: 2988 de la ref. 143, o un polipéptido que comprende una 35

secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de al menos  $n$  aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, en la que  $n$  es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos para (b) comprenden un epítotope de la secuencia relevante. Puede incluirse más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6) de estos polipéptidos.

#### Combinaciones con sacáridos de Hib

Si la composición incluye un antígeno de tipo B de *H. influenzae*, normalmente será un antígeno de sacárido capsular Hib. Los antígenos de sacáridos de *H. influenzae* b son muy conocidos.

Ventajosamente, el sacárido de Hib está covalentemente conjugado con una proteína portadora con el fin de potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacáridos en general, y del polisacárido capsular de Hib en particular, está bien documentada. La invención puede usar cualquier conjugado de Hib adecuado. Proteínas portadoras adecuadas se describen anteriormente, y vehículos preferidos para sacáridos de Hib son CRM<sub>197</sub> ('HbOC'), toxoide tetánico ('PRP-T') y el complejo de la membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

El resto de sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, fosfato de polirribosilribitol (PRP) de longitud completa), pero se prefiere hidrolizar los polisacáridos para formar oligosacáridos (por ejemplo, MW de ~1 a ~5 kDa).

Un conjugado preferido comprende un oligosacárido de Hib ligado covalentemente a CRM<sub>197</sub> por un ligador de ácido adípico [16, 204]. El toxoide tetánico también es un vehículo preferido.

La administración del antígeno de Hib produce preferentemente una concentración de anticuerpo anti-PRP de  $\geq 0,15$   $\mu\text{g/ml}$ , y más preferentemente  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$ .

Si una composición incluye un antígeno de sacárido de Hib, se prefiere que no incluya un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno de Hib puede adsorberse al adyuvante [205] o puede no adsorberse [206]. La prevención de la adsorción puede lograrse seleccionando el pH correcto durante la mezcla de antígeno/adyuvante, un adyuvante con un punto apropiado de carga cero y un orden apropiado de mezcla para los diversos antígenos diferentes en una composición [207].

Las composiciones de la invención pueden comprender más de un antígeno de Hib. Los antígenos de Hib pueden liofilizarse, por ejemplo, para reconstitución por composiciones meningocócicas de la invención.

#### Combinaciones con antígenos pneumocócicos

Si la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, normalmente será un antígeno de sacárido capsular que está preferentemente conjugado con una proteína portadora [por ejemplo, refs. 208 a 210]. Se prefiere incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se usan ampliamente mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes ya que son vacunas de conjugado con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [211]. Por ejemplo, PrevNar™ [212] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) con cada sacárido individualmente conjugado con CRM<sub>197</sub> por aminación reductora, con 2  $\mu\text{g}$  de cada sacárido por 0,5 ml de dosis (4  $\mu\text{g}$  de serotipo 6B) y con conjugados adsorbidos sobre un adyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención incluyen preferentemente al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados pueden adsorberse sobre fosfato de aluminio.

Como una alternativa a usar antígenos de sacárido de pneumococos, la composición puede incluir uno o más antígenos de polipéptidos. Las secuencias del genoma para varias cepas de pneumococos están disponibles [213, 214] y pueden someterse a vacunología inversa [215-218] para identificar antígenos de polipéptidos adecuados [219, 220]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los siguientes antígenos: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sip130, como se define en la referencia 221. La composición puede incluir más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14) de estos antígenos.

En algunas realizaciones, la composición puede incluir tanto antígenos de sacáridos como de polipéptidos de pneumococos. Éstos puede usarse en mezcla simple, o el antígeno de sacárido pneumocócico puede conjugarse con una proteína pneumocócica. Proteínas portadoras adecuadas para tales realizaciones incluyen los antígenos enumerados en el párrafo previo [221].

Los antígenos pneumocócicos pueden liofilizarse, por ejemplo, junto con antígeno de Hib.

#### Procedimientos de tratamiento

La invención también proporciona una composición farmacéutica de la invención para su uso en un procedimiento para producir una respuesta de anticuerpos en un mamífero que comprende administrar la composición farmacéutica de la invención al mamífero.

La invención proporciona una composición de la invención para su uso en un procedimiento para producir una respuesta inmunitaria en un mamífero que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de la composición de la invención. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos. El procedimiento puede producir una respuesta de refuerzo.

- 5 El mamífero es preferentemente un ser humano. Si la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o lactante) o un adolescente; si la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adulto. Una vacuna prevista para niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

- 10 La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como un medicamento. El medicamento es preferentemente capaz de producir una respuesta inmunitaria en un mamífero (es decir, es una composición inmunogénica) y es más preferentemente una vacuna.

- 15 La invención también proporciona el uso de un sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135 modificado de la invención y/o un sacárido capsular meningocócico del serogrupo Y modificado de la invención en la preparación de un medicamento para producir una respuesta inmunitaria en un mamífero. Los sacáridos están preferentemente conjugados. El medicamento es preferentemente una vacuna.

Estos usos y procedimientos son preferentemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad producida por una *Neisseria* (por ejemplo, meningitis, septicemia, bacteremia, gonorrea, etc.). Se prefiere la prevención y/o el tratamiento de meningitis bacteriana y/o meningocócica.

- 20 Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por *Neisseria* después de la administración de la composición de la invención. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar respuestas inmunitarias contra los cinco antígenos básicos después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de composiciones de la invención puede determinarse administrándolas para probar sujetos (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad, o modelos animales [222]) y luego determinando parámetros estándar que incluyen anticuerpos bactericidas del suero (SBA) y títulos de ELISA (GMT) de IgG anti-cápsula total y de alta afinidad. Estas respuestas inmunitarias se determinarán generalmente aproximadamente 4 semanas después de la administración de la composición, y en comparación con valores determinados antes de la administración de la composición. SBA mide la destrucción bacteriana mediada por complemento y puede ensayarse usando complemento humano o de conejo bebé. Los patrones de la OMS requieren que una vacuna induzca al menos un aumento de 4 veces en los SBA en más del 90% de los receptores. Se prefiere un aumento de SBA de al menos 4 veces u 8 veces. Si se administra más de una dosis de la composición puede hacerse más de una determinación postratamiento.

- 35 Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que es superior al criterio para la seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Son muy conocidos los antígenos con un título de anticuerpos asociado por encima del cual un huésped se considera que está seroconvertido contra el antígeno, y tales títulos se publican por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente más de un 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos está seroconvertida, más preferentemente más de un 90%, todavía más preferentemente más de un 93%, y lo más preferentemente el 96-100%.

- 40 Las composiciones de la invención se administrarán generalmente directamente a un paciente. La administración directa puede llevarse a cabo por inyección parenteral (por ejemplo, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente o al espacio intersticial de un tejido), o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra mucosa. Se prefiere la administración intramuscular al muslo o al brazo superior. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es 0,5 ml.

- 45 La invención puede usarse para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa.

- El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. La dosis múltiple puede usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de refuerzo de la inmunización. Un programa de dosis primaria puede ir seguido de un programa de dosis de refuerzo. El momento adecuado entre dos dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre la sensibilización y el refuerzo, puede determinarse rutinariamente.

- 55 Las infecciones por *Neisseria* afectan diversas áreas del cuerpo y, por tanto, las composiciones de la invención pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración por vía oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un spray. La composición puede prepararse como un

supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como espray, gotas, gel o polvo [por ejemplo, las refs. 223 y 224]. Se ha informado del éxito con la administración nasal de sacáridos neumocócicos [225, 226], polipéptidos neumocócicos [227], sacáridos de Hib [228], sacáridos de MenC [229] y mezclas de conjugados de sacáridos de Hib y MenC [230].

## 5 *Información general*

El término “que comprende” significa “que incluye”, además de “consiste en”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede consistir en exclusivamente X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Si es necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

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

Expresiones tales como “ $\leq x\%$  de los residuos de ácido siálico están O-acetilados en la posición 7” no significan que cada molécula de sacárido en una composición deba necesariamente tener el mismo grado de O-acetilación en la posición 7. Ni significa que cada molécula de sacárido en una composición deba tener necesariamente  $\leq x\%$  de O-acetilación en la posición 7. Más bien, algunas pueden tener  $>x\%$  mientras que otras tienen  $<x\%$ , pero el grado promedio de acetilación a lo largo de las 7 posiciones de todos los residuos de ácido siálico en la población de sacáridos total es  $\leq x\%$ . Lo mismo se aplica a expresiones como “ $\geq y\%$  de los residuos de ácido siálico están O-acetilados en la posición 9” y similares.

Se apreciará que pueden existir anillos de azúcar en forma abierta y cerrada y que, mientras que las formas cerradas se muestran en formulas estructurales en este documento, las formas abiertas también están englobadas por la invención.

El ácido siálico también se conoce como ácido neuramínico.

### **Breve descripción de las figuras**

Las Figuras 1 y 2 muestran espectros de RMN anotados de MenW135 y MenY hidrolizados, respectivamente.

Las Figuras 3 y 4 muestran el estado de O-acetilación de los residuos de ácido siálico en las posiciones 7 y 9 durante la preparación de conjugados de MenW135-CRM<sub>197</sub> y MenY-CRM<sub>197</sub>, respectivamente.

Las Figuras 5 y 6 muestran títulos de IgG obtenidos en ratones contra antígenos de oligosacáridos usando MenW135 y MenY, respectivamente.

### **Modos para llevar a cabo la invención**

#### 30 **A. Producción y purificación de polisacáridos meningocócicos**

Los polisacáridos capsulares se purificaron a partir de MenW135 y MenY como se describe en la ref. 14.

#### **B. Preparación de conjugados de polisacáridos del serogrupo W135 y Y modificados**

Los polisacáridos purificados se hidrolizaron en tampón acético/acetato sódico 50 mM, pH 4,7 durante aproximadamente 3 horas a 80°C. Esto produjo oligosacáridos con un DP promedio de aproximadamente 15 a 20 como se ha determinado por la relación entre ácido siálico (SA) y SA terminal reducido.

El hidrolizado se ultrafiltró a través de una membrana de 30 kDa de corte (12 a 20 volúmenes de diafiltración de tampón acetato 5 mM / NaCl 15-30 mM a pH 6,5). El concentrado, que contenía las especies de alto MW, se desechó, mientras que el permeado se cargó sobre una columna Q-Sepharose Fast Flow equilibrada en tampón acetato 5 mM / NaCl 15 mM a pH 6,5. Entonces, la columna se lavó con 10 VC de tampón de equilibrio con el fin de eliminar los oligosacáridos con  $DP \leq 3-4$  y se eluyeron con 3 VC de tampón acetato 5 mM / NaCl 500 mM a pH 6,5.

Se añadió cloruro de amonio o acetato de amonio a la disolución de oligosacárido dimensionado a una concentración final de 300 g/l, luego se añadió ciano-borohidruro de sodio a 49 g/l o 73 g/l de concentración final. La mezcla se incubó a 50°C durante 3 días para producir amino-oligosacáridos, que luego se purificaron por ultrafiltración de flujo tangencial con una membrana de 1 kDa o 3 kDa de corte usando 13 volúmenes de diafiltración de NaCl 0,5 M, seguido de 7 volúmenes de diafiltración de NaCl 20 mM. Entonces, los oligosacáridos purificados se secaron con evaporador rotatorio para eliminar el agua.

Los amino-oligosacáridos secados se solubilizaron en agua destilada a una concentración de grupo amino 40 mM, luego se añadieron 9 volúmenes de DMSO seguido de trietilamina a una concentración final de 200 mM. A la disolución resultante se añadió N-hidroxisuccinimidodiestéer de ácido adípico para una concentración final de 480 mM. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, entonces el oligosacárido

activado se precipitó con acetona (80% v/v de concentración final). El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó varias veces con acetona para eliminar el N-hidroxisuccinimidodiesté de ácido adípico y los subproductos sin reaccionar. Finalmente, el oligosacárido activado se secó a vacío. La cantidad de grupos éster activos introducidos en la estructura del oligosacárido se determinó por un procedimiento colorimétrico como se describe en la ref. 231.

- 5 El oligosacárido activado seco se añadió a una disolución de 45 mg/ml de CRM<sub>197</sub> en tampón fosfato 0,01 M a pH 7,2 para una relación de éster activo/proteína (mol/mol) de 12:1. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante la noche. Después de este periodo, el conjugado se purificó por diafiltración con una membrana de 30 kDa (50 volúmenes de diafiltración de tampón fosfato 10 mM, pH 7,2). El conjugado purificado se esterilizó por filtración y se guardó a -20°C o -60°C hasta la formulación de la vacuna.

#### 10 **C. Estado de O-acetilación de polisacáridos durante la conjugación**

El estado de O-acetilación de las posiciones C7 y C9 de los residuos de ácido siálico en la población de sacáridos modificados derivados de MenW135 y Men Y se midió por análisis de RMN.

- 15 Los poli- y oligo-sacáridos intermedios del procedimiento de conjugación (polisacárido nativo, después de la hidrólisis, antes de la aminación, después de la activación y después de la conjugación) se caracterizaron usando experimentos de RMN de protón 1D y 2D. Las muestras de RMN <sup>1</sup>H se prepararon disolviendo oligosacáridos liofilizados en 0,75 ml de 99,9% de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O deuterada (Aldrich™) dando disoluciones concentradas 10-15 mM. En todos los experimentos se usaron tubos de RMN Wilmad de 5 mm.

- 20 Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se registraron a 298 K en un espectrómetro de RMN de Bruker Avance DRX 600 MHz equipado con una unidad de BGU y usando programas de pulsos de Bruker convencionales. Se usó una sonda de resonancia triple TBI de 5 mm con gradientes en z autoblandados. Para procesar los datos se usó el software Bruker XWINNMR 3.0.

- 25 Las condiciones de adquisición espectral convencionales de protones son para recoger puntos de datos de 32 k sobre una ventana espectral de 6000 Hz con 4 barridos. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se transformaron por Fourier después de aplicar una función de ensanchamiento de la línea de 0,1 Hz y se refirieron con respecto al agua mono-deuterada (HDO) a 4,72 ppm.

La asignación de las resonancias y, por tanto, la determinación de la estructura molecular se hicieron basándose en los datos bibliográficos [232, 4].

Para mostrar la asignación de picos, los espectros de RMN anotados de MenW135 hidrolizado y MenY hidrolizado se presentan en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

- 30 La siguiente tabla facilita la proporción de todas las posiciones C7 y C9 del ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico) en la población de sacáridos derivada de MenW135 que se encontró que estaban O-acetiladas durante la preparación del conjugado:

Etapa de preparación	% de O-acetilación en la posición 7	% de O-acetilación en la posición 9
Polisacárido nativo	30,1	25,0
Después de la hidrólisis	16,9	26,4
Antes de la aminación	15,0	26,2
Después de la activación	5,1	26,3
Después de la conjugación	6,3	43,1

- 35 Por tanto, el porcentaje global de O-acetilación del ácido siálico en la posición 7 disminuyó durante la preparación del conjugado de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 6%. Al mismo tiempo, el porcentaje de O-acetilación en la posición 9 aumentó de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 43% (Figura 3). El espectacular cambio observado en la posición 9 en la etapa final muestra que la conjugación selecciona preferencialmente aquellos sacáridos que están O-acetilados en la posición 9.

- 40 Similarmente, el estado de O-acetilación de los residuos de ácido siálico en la población de sacáridos modificados derivados de MenY después de cada etapa del procedimiento de conjugación se facilita en la siguiente tabla:

<b>Etapas de preparación</b>	<b>% de O-acetilación en la posición 7</b>	<b>% de O-acetilación en la posición 9</b>
Polisacárido nativo	10,3	28,0
Después de la hidrólisis	3,3	24,1
Antes de la aminación	5,1	25,1
Después de la activación	2,4	20,9
Después de la conjugación	6,1	45,1

Por tanto, el porcentaje de O-acetilación del ácido siálico en la posición 7 disminuyó durante preparación del conjugado de la presente invención de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 2%, antes de subir finalmente a aproximadamente el 6% durante la reacción de conjugación. Al mismo tiempo, el porcentaje de O-acetilación en la posición 9 disminuyó de aproximadamente el 28% a aproximadamente el 21%, antes de subir finalmente a aproximadamente el 45% durante la reacción de conjugación (Figura 4). El espectacular cambio observado en la posición 9 en la etapa final muestra que la conjugación selecciona preferencialmente aquellos sacáridos que están O-acetilados en la posición 9.

#### 10 **D. Inmunogenicidad de conjugados**

Los conjugados a granel congelados se descongelaron. Cada uno se diluyó, con agitación, a una concentración final de 20 µg de sacárido/ml, fosfato 5 mM, 9 mg/ml de NaCl, fosfato de aluminio (para dar una concentración de Al<sup>3+</sup> de 0,6 mg/ml), pH 7,2. Entonces, las mezclas se mantuvieron, sin agitación, a 2-8°C durante la noche y adicionalmente se diluyeron con solución salina a 4 µg de sacárido/ml para la inmunización de ratones.

15 Se preparó un segundo conjunto de vacunas para ambos serogrupos de la misma forma, pero la adición de fosfato de aluminio se sustituyó con el mismo volumen de agua.

Diez ratones Balb/c para cada grupo de inmunización se inyectaron s.c. dos veces con 0,5 ml de vacuna en las semanas 0 y 4. Los sangrados se realizaron antes de la inmunización, el día antes de la segunda dosis y 2 semanas después de la segunda dosis. Las inmunizaciones se realizaron con (a) la vacuna de conjugado con o sin alumbre, (b) solución salina control y (c) control de polisacárido sin conjugar.

Los anticuerpos específicos dirigidos contra IgG de polisacárido se determinaron en los sueros de animales inmunizados esencialmente como se describe en la ref. 233. Cada suero de ratón individual se analizó por duplicado por una curva de valoración y se calculó el GMT para cada grupo de inmunización. Los títulos se calcularon en unidades de ELISA de ratón (UER) usando el software 'Titerun' (FDA). La especificidad de los títulos anti-polisacárido se determinó por ELISA competitivo con el polisacárido relevante como competidor.

Como se muestra en la Figura 5, el conjugado de MenW135 indujo altos títulos de anticuerpo en animales. Como era de esperar, el polisacárido sin conjugar no fue inmunogénico. La formulación de conjugado con fosfato de aluminio como adyuvante indujo un mayor nivel de anticuerpos en comparación con el título obtenido por el conjugado solo. Se observaron resultados similares para MenY (Figura 6).

30 Los sueros Post-II se probaron para la actividad bactericida usando un ensayo *in vitro* para medir la lisis de bacterias mediada por complemento. Los sueros Post-II se inactivaron durante 30 minutos a 56°C antes del uso en el ensayo, y se usó 25% de complemento de conejo bebé como fuente de complemento. El título bactericida se expresó como dilución de suero recíproca dando el 50% de destrucción de bacterias contra las siguientes cepas: MenW135, 5554 (OAc+); MenY, 242975 (OAc+).

35 Un polisacárido capsular derivado de MenW135 no dio un valor de GMT y dio una actividad bactericida de solo 4. A diferencia, los conjugados des-O-acetilados de la invención dieron valores de GMT entre 14 y 565, con títulos bactericidas entre 64 y 2048.

40 Un polisacárido capsular derivado de MenY no dio un valor de GMT y dio una actividad bactericida de solo 256. A diferencia, los conjugados des-O-acetilados de la invención dieron valores de GMT entre 253 y 1618, con títulos bactericidas entre 256 y 16384.

Se entenderá que la invención sólo se ha descrito a modo de ejemplo y que pueden hacerse modificaciones mientras que se encuentren dentro del alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas. En particular, también se prevén modificaciones menores que no afectan la inmunogenicidad del sacárido capsular modificado de la presente invención.

**Referencias**

- [1] Patente de EE.UU. 4.711.779  
 [2] Patente de EE.UU. 4.761.283  
 [3] Patente de EE.UU. 4.882.317  
 5 [4] Lemercinier y col. (1996) Carbohydr Res 296: 83-96.  
 [5] Jones & Lemercinier (2002) J Pharm Biomed Anal 30:1233-47.  
 [6] Claus y col. (2004) Molecular Microbiology 51:227-39.  
 [7] Longworth y col. (2002) 13th International Pathogenic Neisseria Conference. Resumen, pág. 272.  
 [8] Longworth y col. (2002) FEMS Immunol Med Microbiol 32:119-23.  
 10 [9] Pollard y col. (2003) Emerging Infectious Diseases 9:1503-4.  
 [10] Glode M. P. y col. (1979) J Infect Dis 139:52-56  
 [11] Documento WO94/05325; patente de EE.UU. 5.425.946.  
 [12] Berry y col. (2002) Infect Immun 70:3707-13.  
 [13] Frash (1990) p.123-145 of Advances in Biotechnological Processes vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)  
 15 [14] Documento WO03/007985.  
 [15] Inzana (1987) Infect. Immun. 55:1573-1579.  
 [16] Ravenscroft y col. (1999) Vaccine 17:2802-2816.  
 [17] Kandil y col. (1997) Glycoconj J 14:13-17.  
 [18] Berkin y col. (2002) Chemistry 8:4424-4433.  
 20 [19] Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-6  
 [20] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:528-36  
 [21] Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-8  
 [22] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-33, vii  
 [23] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567  
 25 [24] Documento EP-B-0 477 508  
 [25] Patente de EE.UU. 5.306.492  
 [26] Documento WO98/42721  
 [27] Dick y col. en Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, vol. 10, 48-114  
 [28] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego CA (1996)  
 30 [29] Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.  
 [30] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.  
 [31] Anderson y col. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.  
 [32] Documento EP-A-0372501.  
 [33] Documento EP-A-0378881.  
 35 [34] Documento EP-A-0427347.  
 [35] Documento WO93/17712  
 [36] Documento WO94/03208.  
 [37] Documento WO98/58668.  
 [38] Documento EP-A-0471177.  
 40 [39] Documento WO91/01146  
 [40] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.  
 [41] Baraldo y col. (2004) Infect Immun.72:4884-7  
 [42] Documento EP-A-0594610.  
 [43] Documento WO00/56360.  
 45 [44] Documento WO02/091998.  
 [45] Kuo y col. (1995) Infect Immun 63:2706-13.  
 [46] Documento WO01/72337  
 [47] Documento WO00/61761.  
 [48] Documento WO2004/083251.  
 50 [49] Documento WO99/42130  
 [50] Documento WO96/40242  
 [51] Lees y col. (1996) Vaccine 14:190-198.  
 [52] Documento WO95/08348.  
 [53] Patente de EE.UU. 4.695.624  
 55 [54] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919  
 [55] Documento EP-A-0208375  
 [56] Bethell G.S. y col., J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4  
 [57] Heam M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18  
 [58] Documento EP-A-0208375  
 60 [59] Documento EP0720485  
 [60] Documento EP0814833  
 [61] Documento WO00/10599  
 [62] Gever y col. (1979) Med. Microbiol. Immunol 165:171-288.  
 [63] Patente de EE.UU. 4.057.685.  
 65 [64] Patentes de EE.UU. 4.673.574 y 4.808.700.

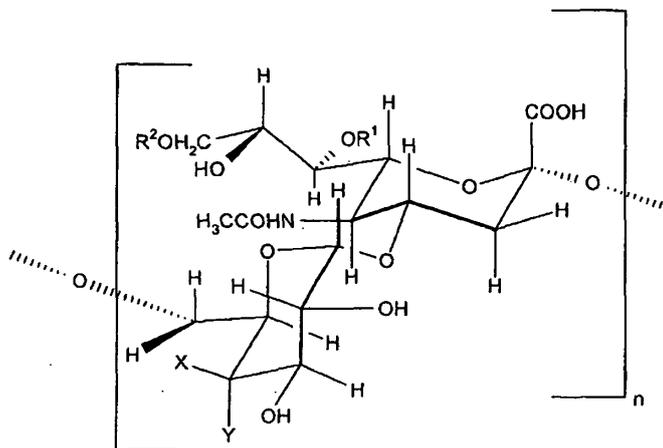
- [65] Patente de EE.UU. 4.459.286.  
 [66] Patente de EE.UU. 4.965.338  
 [67] Patente de EE.UU. 4.663.160.  
 [68] Patente de EE.UU. 4.356.170  
 5 [69] Lei y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103 :259-264.  
 [70] Documento WO00/38711; patente de EE.UU. 6.146.902.  
 [71] Documento WO00/56365  
 [72] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.  
 [73] Documento WO98/20734  
 10 [74] Documento WO03/009869.  
 [75] Vaccine design:the subunit and adjuvant approach (1995) Powell & Newman. ISBN 0-306-44867-X.  
 [76] Documento WO00/23105.  
 [77] Documento WO90/14837.  
 [78] Patente de EE.UU. 5.057.540.  
 15 [79] Documento WO 96/33739.  
 [80] Documento EP-A-0109942.  
 [81] Documento WO96/11711.  
 [82] Documento WO00/07621.  
 [83] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delively Reviews 32:247-271.  
 20 [84] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.  
 [85] Niiikura y col. (2002) Virology 293:273-280.  
 [86] Lenz y col. (2001) J Immunol 166:5346-5355.  
 [87] Pinto y col. (2003) J Infect Dis 188:327-338.  
 [88] Gerber y col. (2001) Virol 75:4752-4760.  
 25 [89] Documento WO03/024480  
 [90] Documento WO03/024481  
 [91] Gluck y col. (2002) Vaccine 20:B10-B16.  
 [92] Documento EP-A-0689454.  
 [93] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.  
 30 [94] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.  
 [95] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21:2485-2491.  
 [96] Pajak y col. (2003) Vaccine 21:836-842.  
 [97] Kandimalla y col. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.  
 [98] Documento WO02/26757.  
 35 [99] Documento WO99/62923.  
 [100] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.  
 [101] McCluskie y col. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.  
 [102] Documento WO98/40100.  
 [103] Patente de EE.UU. 6.207.646.  
 40 [104] Patente de EE.UU. 6.239.116.  
 [105] Patente de EE.UU. 6.429.199.  
 [106] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.  
 [107] Black-well y col. (2003) J Immunol 170:4061-4068.  
 [108] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.  
 45 [109] Documento WO 01/95935.  
 [110] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306:948-953.  
 [111] Bhagat y col. (2003) BBRC 300:853-861.  
 [112] Documento WO03/035836.  
 [113] Documento WO95/17211.  
 50 [114] Documento WO98/42375.  
 [115] Beignon y col. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.  
 [116] Pizza y col. (2001) Vaccine 19:2534-2541.  
 [117] Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.  
 [118] Scharton-Kersten y col. (2000) Infect Immun 68:5306-5313.  
 55 [119] Ryan y col. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.  
 [120] Partidos y col. (1999) Immunol Lett 67:209-216.  
 [121] Peppoloni y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-293.  
 [122] Pine y col. (2002) J Control Release 85:263-270.  
 [123] Domenighini y col. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.  
 60 [124] Documento WO99/44636.  
 [125] Singh y col. (2001) J Cont Release 70:267-276.  
 [126] Documento WO99/27960.  
 [127] Patente de EE.UU. 6.090.406  
 [128] Patente de EE.UU. 5.916.588  
 65 [129] Documento EP-A-0626169.  
 [130] Documento WO99/52549.

- [131] Documento WO01/21207.  
 [132] Documento WO01/21152.  
 [133] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.  
 [134] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.  
 5 [135] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.  
 [136] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.  
 [137] Documento WO99/11241.  
 [138] Documento WO94/00153.  
 [139] Documento WO98/57659.  
 10 [140] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.  
 [141] Documento WO99/24578.  
 [142] Documento WO99/36544.  
 [143] Documento WO99/157280.  
 [144] Documento WO00/22430.  
 15 [145] Documento WO01/64920.  
 [146] Documento WO01/64922.  
 [147] Documento WO03/020756.  
 [148] Tettelin y col. (2000) *Science* 287:1809-1815.  
 [149] Documento WO96/29412.  
 20 [150] Pizza y col. (2000) *Science* 287:1816-1820.  
 [151] Documento WO02/09643.  
 [152] Katial y col. (2002) *Infect Immun* 70:702-707.  
 [153] Documento WO01/52885.  
 [154] Patente europea 0301992.  
 25 [155] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.  
 [156] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.  
 [157] Documento WO02/09746.  
 [158] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.  
 [159] Documento WO01/09350.  
 30 [160] Patente europea 0449958.  
 [161] Documento EP-A-0996712.  
 [162] Documento EP-A-0680512.  
 [163] Documento WO02/062378.  
 [164] Documento WO99/59625.  
 35 [165] Patente de EE.UU. 6.180.111.  
 [166] Documento WO01/34642.  
 [167] Documento WO03/051379.  
 [168] Patente de EE.UU. 6,558,677  
 [169] Documento WO2004/019977  
 40 [170] Documento WO02/062380.  
 [171] Documento WO00/25811.  
 [172] Peeters y col. (1996) *Vaccine* 14:1008-1015.  
 [173] Vermont y col. (2003) *Infect Immun* 71:1650-1655.  
 [174] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.  
 45 [175] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.  
 [176] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.  
 [177] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.  
 [178] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J Med.* 334:349-355.  
 [179] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.  
 50 [180] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.  
 [181] Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.  
 [182] Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.  
 [183] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.  
 [184] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.  
 55 [185] Donnelly y col. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.  
 [186] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.  
 [187] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.  
 [188] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.  
 [189] Dubensky y col. (2000) *Mol Med* 6:723-732.  
 60 [190] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.  
 [191] Donnelly y col. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.  
 [192] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.  
 [193] Charalambous & Feavers (2001) *J Med Microbiol* 50:937-939.  
 [194] Westerink (2001) *Int Rev Immunol* 20:251-261.  
 65 [195] Grothaus y col. (2000) *Vaccine* 18:1253-1263.  
 [196] Documento WO03/080678.

- [197] Documento WO98/08543.  
 [198] Documento WO2004/032958 y solicitudes de patente de RU 0223741.0, 0305831.0 y 0309115.4.  
 [199] <http://neisseria.org/nml/typing/mlst/>  
 5 [200] Pettersson y col. (1994) *Microb Pathog* 17(6):395-408.  
 [201] Maiden y col. (1998) *PNAS USA* 95:3140-3145.  
 [202] Welsch y col. (2002) 13th International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C *Neisseria meningitidis* strains.  
 10 [203] Santos y col. (2002) 13th International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of *N. meningitidis*.  
 [204] Kanra y col. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.  
 [205] Documento WO97/00697.  
 [206] Documento WO02/00249.  
 15 [207] Documento WO96/37222; patente de EE.UU. 6.333.036.  
 [208] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.  
 [209] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.  
 [210] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.  
 [211] Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.  
 20 [212] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.  
 [213] Tettelin y col. (2001) *Science* 293:498-506.  
 [214] Hoskins y col. (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.  
 [215] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450  
 [216] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691.  
 25 [217] Masignani y col. (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.  
 [218] Mora y col. (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.  
 [219] Witzemann y col. (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.  
 [220] Rigden y col. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.  
 [221] Documento WO02/22167.  
 30 [222] Documento WO01/30390.  
 [223] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.  
 [224] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.  
 [225] Documento WO00/53221.  
 [226] Jakobsen y col. (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.  
 35 [227] Wu y col. (1997) *J Infect Dis* 175:839-846.  
 [228] Bergquist y col. (1998) *APMIS* 106:800-806.  
 [229] Baudner y col. (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.  
 [230] Ugozzoli y col. (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.  
 [231] Miron & Wilchek (1982) *Anal. Biochem.* 126:433-435.  
 40 [232] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.  
 [233] Carlone y col. (1992) *J. Clin. Microbiol.* 30:154-159.  
 [234] Kao & Tsai (2004) *Vaccine* 22:335-44.  
 [235] Cescutti y col. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* 224:444-50.

## REIVINDICACIONES

1. Un sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135 modificado conjugado con una proteína portadora, en el que: (a) entre el 2-9% de los residuos de ácido siálico en el sacárido están O-acetilados en la posición 7; y/o (b) entre el 35-55% de los residuos de ácido siálico en el sacárido están O-acetilados en la posición 9.
- 5 2. Un sacárido capsular meningocócico del serogrupo Y modificado conjugado con una proteína portadora, en el que (a) entre el 2-9% de los residuos de ácido siálico en el sacárido están O-acetilados en la posición 7; y/o (b) entre el 35-55% de los residuos de ácido siálico en el sacárido están O-acetilados en la posición 9.
3. El sacárido capsular meningocócico modificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que entre el 4-8% de los residuos de ácido siálico en el sacárido están O-acetilados en la posición 7.
- 10 4. El sacárido capsular meningocócico modificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que entre el 40-50% de los residuos de ácido siálico en el sacárido están O-acetilados en la posición 9.
5. Un sacárido capsular meningocócico modificado conjugado con una proteína portadora, en el que el sacárido comprende  $n$  o más unidades de repetición de la unidad de disacárido:  
[ácido siálico] - [hexosa]
- 15 en la que la hexosa es tanto galactosa como glucosa y  $n$  es un número entero de 1 a 100, y en la que:
- (a)  $x\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 7; y/o
- (b) si la hexosa es galactosa,  $y\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 9, y si la hexosa es glucosa,  $y\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha
- 20  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 9,
- en la que: cuando la hexosa es galactosa,  $x$  es entre 2-9 y  $y$  es entre 35-55; y si la hexosa es glucosa,  $x$  es entre 2-9, y  $y$  es entre 35-55.
6. El sacárido de la reivindicación 5, en el que la hexosa es galactosa,  $6\pm 0,6\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 7 y  $43\pm 4,3\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 9.
- 25 7. El sacárido de la reivindicación 5, en el que la hexosa es glucosa,  $6\pm 0,6\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 7 y  $45\pm 4,5\%$  de los residuos de ácido siálico en dicha  $n$  o más unidades de repetición están O-acetilados en la posición 9.
8. Una composición que comprende  $a$  moléculas de sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135, en la que (i) el número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de sacárido capsular es  $b$ , y en la que: (a) entre el 2-9% de los  $a \cdot b$  residuos de ácido siálico del serogrupo W135 en la composición están O-acetilados en la posición 7; y/o (b) entre el 35-55% de los  $a \cdot b$  residuos de ácido siálico del serogrupo W135 en la composición están O-acetilados en la posición 9; y (ii) el sacárido está conjugado con una proteína portadora.
- 30 9. Una composición que comprende una moléculas de sacárido capsular meningocócico del serogrupo Y, en la que (i) el número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de sacárido capsular es  $b$ , y en la que: (a) entre el 2-9% de los  $a \cdot b$  residuos de ácido siálico del serogrupo Y en la composición están O-acetilados en la posición 7; y/o (b) entre el 35-55% de los  $a \cdot b$  residuos de ácido siálico del serogrupo Y en la composición están O-acetilados en la posición 9; y (ii) el sacárido está conjugado con una proteína portadora.
- 35 10. Un sacárido que comprende  $n$  o más repeticiones de la siguiente unidad de disacárido:



en la que:

- $n$  es un número entero de 1 a 100,
  - X y Y son grupos diferentes seleccionados de -H y -OH,
  - $R_1$  se selecciona independientemente de -H y -COCH<sub>3</sub> y pueden ser iguales o diferentes en cada unidad de disacárido,
  - $R_2$  se selecciona independientemente de -H y -COCH<sub>3</sub> y pueden ser iguales o diferentes en cada unidad de disacárido, y,
    - cuando X es -OH y Y es -H, (a) 2-10% de  $R^1$  son -COCH<sub>3</sub> y/o (b) 35-55% de  $R^2$  son -COCH<sub>3</sub>,
    - cuando X es -H y Y es -OH, (a) 2-9% de  $R^1$  son -COCH<sub>3</sub> y/o (b) 35-55% de  $R^2$  son -COCH<sub>3</sub>,
- 5
- 10 y en la que el sacárido está conjugado con una proteína portadora.
11. El sacárido de cualquier reivindicación precedente, en el que el sacárido tiene un grado de polimerización promedio inferior a 30.
12. El sacárido de cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína portadora se selecciona del grupo que consiste en: toxoide diftérico, toxoide tetánico, proteína D de *H. influenzae* y CRM<sub>197</sub>.
- 15 13. Una composición inmunogénica que comprende (a) un sacárido capsular modificado conjugado de cualquier reivindicación precedente y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. La composición de la reivindicación 13 en forma acuosa.
15. La composición de la reivindicación 13 en forma liofilizada.
- 20 16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 que comprende además un antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*.
17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 que comprende además un antígeno de sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*.
18. La composición de la reivindicación 17, en la que el antígeno de serogrupo A es un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo en el sacárido nativo han sido sustituidos por un grupo de bloqueo.
- 25 19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18 que comprende además un antígeno del serogrupo B de *N. meningitidis*.
20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19 que comprende además un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B.
- 30 21. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20 que comprende además un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.
22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21 que comprende además uno o más de: un antígeno del virus de la hepatitis A; un antígeno del virus de la hepatitis B; un antígeno de *Bordetella pertussis*; un toxoide diftérico; un toxoide tetánico; y/o un antígeno del virus de la poliomielitis.
23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22 para su uso como un medicamento.
- 35 24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22 para su uso en un procedimiento para producir una respuesta de anticuerpos en un mamífero.
25. El uso de un sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135 modificado conjugado y/o un sacárido capsular meningocócico del serogrupo Y modificado conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la preparación de un medicamento para proteger contra meningitis meningocócica.
- 40 26. Un procedimiento para preparar un conjugado inmunogénico que comprende las etapas de: (1) proporcionar un sacárido capsular meningocócico del serogrupo W135 o del serogrupo Y de partida y una proteína portadora, estando cualquiera de los dos o ambos opcionalmente modificados para volverse reactivo(s) contra el (os) otro(s); (2) formar un enlace covalente entre el sacárido y la proteína portadora; y (3) purificar los glicoconjugados resultantes, aumentando entre las etapas (1) y (3) el grado de O-acetilación en la posición 9 de residuos de ácido siálico en el sacárido de partida al 35-55%.
- 45

Figura 1

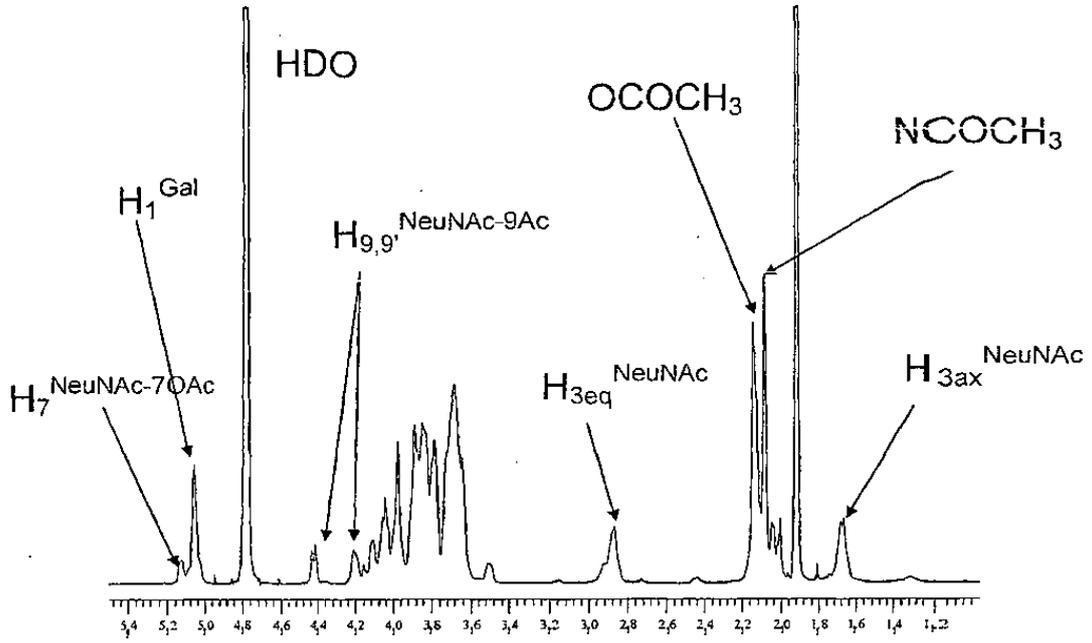


Figura 2

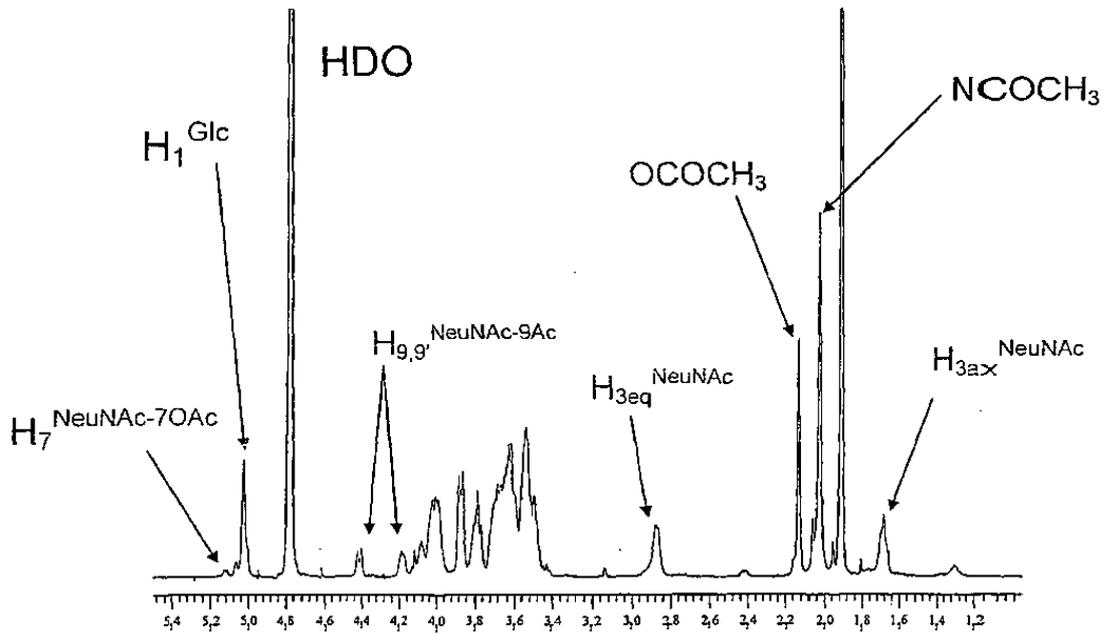


Figura 3

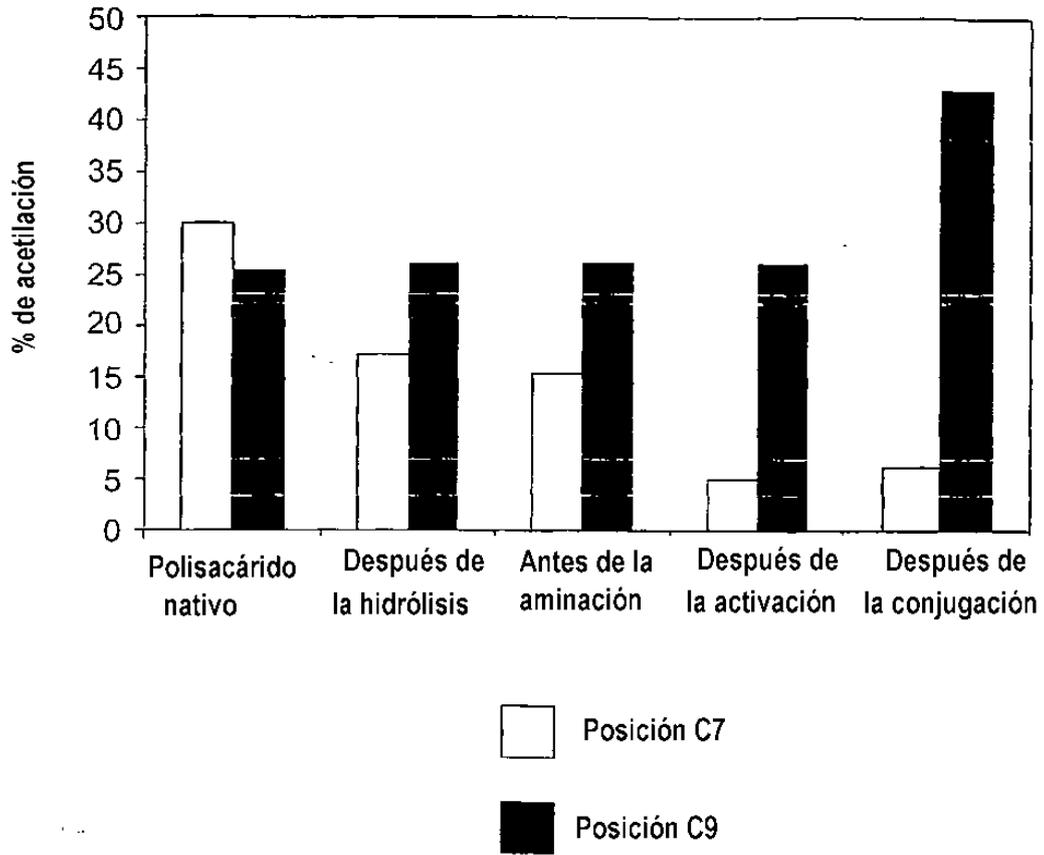


Figura 4

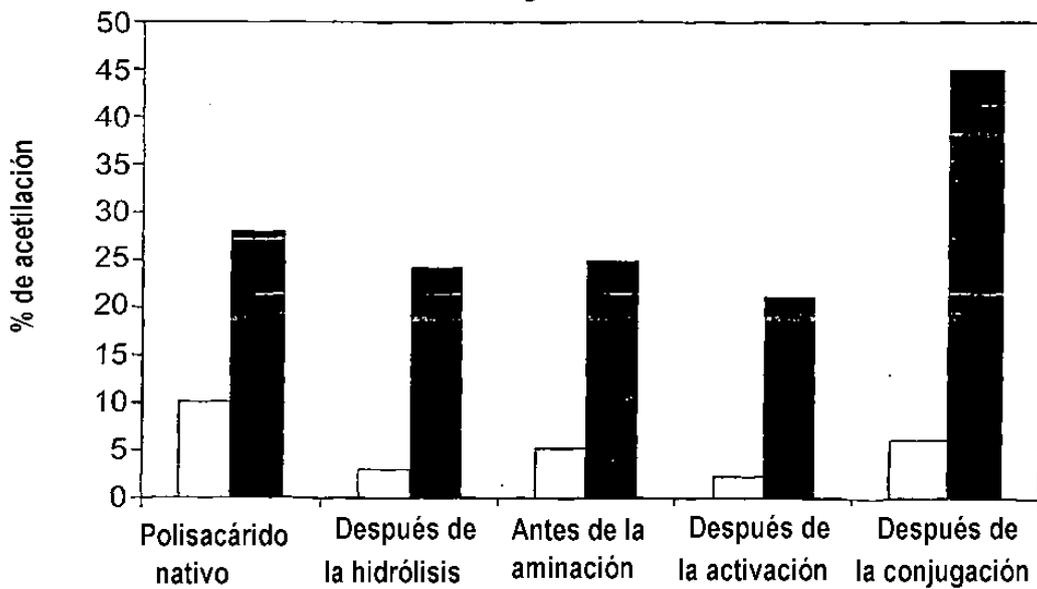


Figura 5

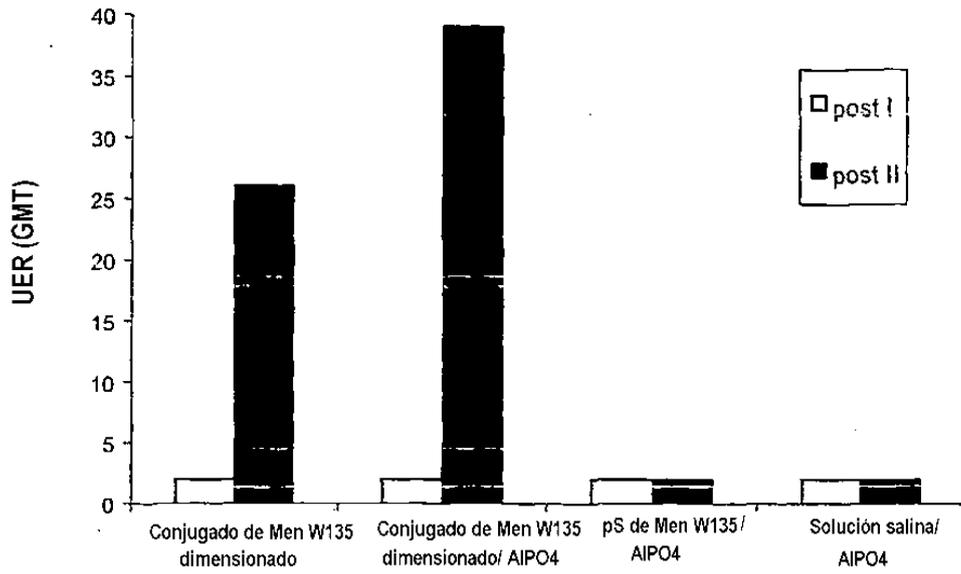


Figura 6

