

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 180**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2012 E 12712748 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2686009**

54 Título: **Método para preparar conjugados de carbohidrato-glicopéptido de antígeno múltiple**

30 Prioridad:

17.03.2011 EP 11290138

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

03.06.2015

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (50.0%)
28 rue du Docteur Roux
75015 Paris, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BAY, SYLVIE;
LECLERC, CLAUDE y
LO-MAN, RICHARD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 537 180 T3

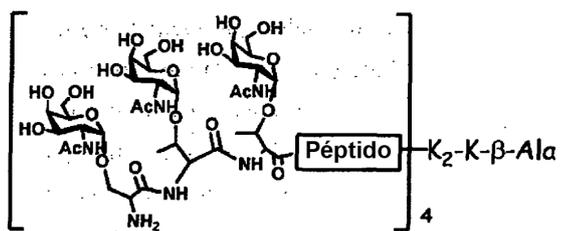
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar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

DESCRIPCIÓN

Método para preparar conjugados de carbohidrato-glicopéptido de antígeno múltiple

La presente invención se refiere a un método para preparar conjugados de epitopos de células T que contienen carbohidratos de fórmula (I), y a intermedios de epitopos de células T que contienen carbohidratos de fórmula (II) útiles según dicho método.

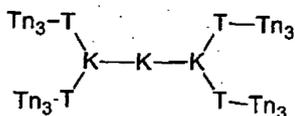
Durante la última década se ha desarrollado el MAG-Tn3, un nuevo tipo de inmunógeno sintético que muestra el antígeno Tn asociado a tumor. El MAG-Tn3 es un glicopéptido totalmente sintético (PM = 10.897 Da) que asocia el antígeno Tn que contiene carbohidratos (como una agrupación tri-Tn) a un epitopo de células T CD4⁺ peptídico sobre un esqueleto tetravalente [5, 9].



MAG-Tn3

MAG-Tn3 se corresponde con la siguiente estructura [S(α-D-GalNAc)-T(α-D-GalNAc)-T(α-D-GalNAc)-QY⁹IKANS¹⁰KFIGI¹⁵TEL]₄-K₂-K-β-Ala:

MAG se refiere a glicopéptido de antígeno múltiple.



Así, MAG-Tn3 se corresponde con un conjugado de carbohidrato y péptido B4-T4-M con la siguiente fórmula: en la que:

- KKK es el núcleo de polilisina dendrítico (M),
- T es el epitopo de células T CD4⁺ peptídico que tiene la siguiente secuencia: QYIKANSKFIGITEL,
- Tn3 es el epitopo de células B tri-Tn que tiene la siguiente secuencia: (α-GalNAc)Ser-(α-GalNAc)Thr-(α-GalNAc)Thr.

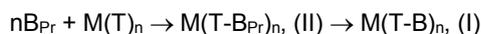
Basándose en los resultados obtenidos con éxito *in vivo* en ratones y primates [8, 9], el MAG-Tn3 es un buen candidato a vacuna teraéutica para tratar carcinomas que debería avanzar hacia un ensayo clínico de fase I/II.

Una vía sintética para preparar conjugados de carbohidratos y péptidos, tales como, de forma notable, MAG-Tn3, se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 98/43677 y en la patente de EEUU n.º 6.676.946. En este proceso, realizado a pequeña escala (1-10 mg de compuesto final), el antígeno Tn3 que contiene carbohidratos se incorpora al bloque constituyente de péptido dendrítico M(T)₄. Debe advertirse que la incorporación del antígeno Tn3 se logra con el azúcar totalmente desprotegido, lo cual puede parecer ventajoso puesto que se evita una etapa de desprotección final.

Sin embargo, los inventores han demostrado que este método fracasa cuando se aumenta de escala. En efecto, la incorporación de restos Tn extra es difícil de controlar y afecta a la pureza bruta y al rendimiento global. Además, la purificación de este glicopéptido de alto peso molecular es compleja.

Así, es necesario un método mejorado para preparar MAG-Tn3 que supere los inconvenientes de la técnica anterior, en particular que permita obtener unos mejores rendimientos y pureza, de forma notable a mayor escala y de una manera repetible.

Así, la presente invención, en un aspecto, proporciona un nuevo proceso para preparar MAG-Tn3, y más en general conjugados de epitopos de células T que contienen carbohidratos de fórmula (I) $(M(T-B)_n)$, que permite una producción a gran escala, con mejor rendimiento y pureza:



- 5 El método según la invención permite, de forma ventajosa, minimizar los subproductos de la síntesis, mejorar la robustez del proceso, y aumentar la escala de la síntesis de una manera repetible.

De modo más específico, se ha descubierto que la protección de los grupos hidroxilo del epitopo de células B que contiene carbohidratos con un grupo protector adecuado (Pr), antes de incorporar el epitopo de células B al bloque constituyente $M(T)_n$, permite un mejor control de la incorporación del epitopo de células B y, así, se mejora el rendimiento y la pureza, en particular a gran escala.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevos conjugados de epitopos de células T que contienen carbohidratos de fórmula (II) $(M(T-B_{Pr})_n)$, siendo dichos compuestos útiles para la preparación de conjugados de epitopos de células T que contienen carbohidratos de fórmula $M(T-B)_n$ con mayor rendimiento y pureza.

Otro objeto es proporcionar conjugados de epitopos de células T que contienen carbohidratos de fórmula (I) $(M(T-B)_n)$ que tienen un grado de pureza mayor que 95% que pueden obtenerse mediante el proceso según la invención.

Estos y otros objetos, características y ventajas del método según la invención se describirán en la siguiente descripción detallada de la memoria descriptiva de la patente.

Así, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos de fórmula (I):

20 $M(T-B)_n (I)$

en la que:

M es un núcleo de polilisina dendrimérico;

T es un epitopo de células T que comprende un péptido;

B es un epitopo de células B que contiene carbohidratos que comprende al menos un resto carbohidrato (b);

25 n es un número entero y representa el número de grupos -T-B unidos covalentemente a M;

y dicho método comprende las etapas de:

i) acoplar un epitopo de células B que contiene carbohidratos protegido (B_{Pr}), cuyos grupos hidroxilo del resto carbohidrato (b) están protegidos con un grupo protector (Pr), con un compuesto $M(T)_n$, formando con ello un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos $M(T-B_{Pr})_n$, seleccionándose dicho grupo protector (Pr) del grupo que consiste en alilo, *p*-metoxibencilo (PMB), *t*-butildimetilsililo (TBDMS), benciloximetilo (BOM), levulinilo (Lev), benzoílo (Bz), 2,5-difluorobenzoílo, cloroacetilo, bencilo (Bn) o un acetilo (Ac), o formando, con los dos grupos hidroxilo a los cuales está unido, un isopropilidén cetal C_5-C_6 o un alquilcarbonato cíclico C_5-C_6 ; y

ii) retirar los grupos protectores Pr del conjugado $M(T-B_{Pr})_n$ obtenido, obteniendo con ello el conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos $M(T-B)_n$.

35 *Núcleo de polilisina dendrimérico (M)*

El núcleo de polilisina del conjugado de fórmula (I) es una estructura dendrimérica, que puede representarse como una estrella que tienen múltiples ramificaciones (-T-B), que pueden o no ser idénticas.

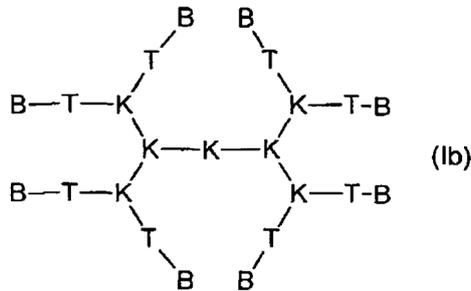
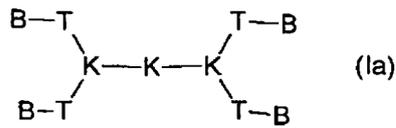
Estas ramificaciones están unidas covalentemente al extremo NH_2 de cada resto lisina del núcleo dendrimérico, de forma notable a través de un enlace peptídico $-NH-C(=O)-$.

40 La valencia m del núcleo de polilisina dendrimérico (M), es decir, el número de extremos NH_2 de cada resto lisina, es tal que $m \geq n$, preferiblemente $m = n$, siendo n el número de ramificaciones (-T-B) unidas covalentemente a M.

En otro aspecto, el número de ramificaciones (-T-B) n varía de 4 a 16, de forma notable de 4 a 8.

En otro aspecto, el núcleo de polilisina dendrimérico M comprende al menos 3 restos lisina, en particular de 3 a 15 restos lisina, más en concreto de 3 a 7 restos lisina.

45 En otro aspecto, el conjugado $M(T-B)_n$ se selecciona de las siguientes fórmulas (Ia) o (Ib):



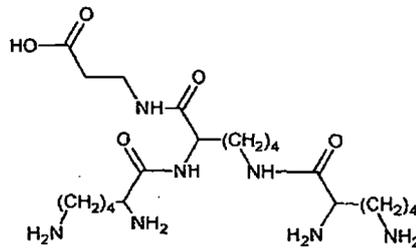
en las que:

K es un resto lisina, y

T y B son como se definió anteriormente.

5 De forma ventajosa, las estructuras dendriméricas (la) y (lb) proporcionan una alta densidad de antígenos sobre la superficie del núcleo de polilisina dendrimérico M.

En otro aspecto, M es $(K)_2K\text{-}\beta\text{Ala-OH}$ de la siguiente fórmula:



Ramificaciones (T-B)

La presencia de epitopos de células T y epitopos de células B que contienen carbohidratos sobre el conjugado de fórmula (I) hace que este sea un inmunógeno eficaz.

10 Epitopos de células T

Tal como se emplea en la presente, un epitopo de células T significa un antígeno, en particular de naturaleza peptídica, capaz de inducir una respuesta de células T.

15 Estos epitopos se describen, de forma notable, en S. Stevanovic, "Identification of Tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development", Nature Reviews, vol. 2, July 2002, pp. 1 a 7; J.H. Kessler, C.J.M. Melief, "Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy", Leukemia (2007), 21, 1859-1874; o en el sitio web de la base de datos de péptidos/inmunidad del cáncer: http://www.cancerimmunity.org/peptide_database/tumorspecific.htm.

Los epitopos de células T incorporados en el conjugado de fórmula (I) pueden ser iguales o diferentes, peptídicos o no peptídicos.

20 En un aspecto concreto, los conjugados de epitopos de células T que contienen carbohidratos son conjugados de carbohidrato y péptido. Los epitopos de células T peptídicos pueden comprender de 2 a 50 aminoácidos.

Los epitopos de células T pueden seleccionarse, de forma notable, de epitopos de células T $CD8^+$ o $CD4^+$.

Los epitopos de células T $CD8^+$, reconocidos como marcadores tumorales, pueden seleccionarse del grupo que consiste en:

- péptidos MUC-1 (páncreas, mama),
- MAGE 1 y 3 (melanoma, pulmón) (T. Boon et al. (1995), Immunology Today, vol. 16, n.º 7, pp. 334-336),
- pme117/gp 100 (melanoma),
- tirosinasa (melanoma) BAGE (melanoma),
- 5 - GAGE (melanoma) LB-33-B (melanoma),
- CDK4,
- p185^{HER} (mama, ovario),
- CEA MART1/Melan- A (melanoma),
- 10 - o se seleccionan del grupo que consiste en los antígenos tumorales descritos en A. Van Pel et al. (1995), Immunological. Reviews, n.º 145, pp. 229-250, o en P. G. Coulie (1995), Stem Cells, 13, pp. 393-403.

En un aspecto concreto, T es o comprende un epitopo de células T CD4⁺, que notablemente puede ser un fragmento de proteína de poliovirus (PV), un fragmento de la toxina del tétanos, o un péptido PADRE.

- 15 Como ejemplo de epitopo de células T CD4⁺ seleccionado entre fragmentos de proteínas de poliovirus (PV), puede mencionarse el péptido sintético que se corresponde con la secuencia 103-115 de la proteína VP1 del poliovirus de tipo 1 (KLFVAVWKITYKDT) (SEQ ID NO:4).

Como ejemplo de epitopo de células T CD4⁺ seleccionado entre fragmentos de la toxina del tétanos, pueden mencionarse los siguientes fragmentos:

- secuencia 830-844 de la toxina del tétanos (QYIKANSKFIGITEL) (SEQ ID NO:1),
- secuencia 947-967 de la toxina del tétanos (FNFTVSFVLRVLPKVSASHLE) (SEQ ID NO:2)
- 20 - secuencia 1273-1284 de la toxina del tétanos (GQIGNDPNDIL) (SEQ ID NO:3).

- 25 Estos epitopos de células T peptídicos generalmente se unen a una pluralidad de moléculas humanas y murinas del MHC (complejo de histocompatibilidad mayor) de clase II, evitando en consecuencia los problemas de restricción que aparecen con la respuesta de células T CD4⁺, asociados con el polimorfismo de las moléculas de MHC que existe entre individuos. Además, el uso de péptidos de la toxina del tétanos debería de aumentar la inmunogenicidad de los antígenos presentes sobre el conjugado de la presente invención, como resultado de la vacunación de numerosos individuos con el toxoide del tétanos.

- 30 Como otros ejemplos de epitopos de células T peptídicos, se hace referencia a S. Stevanovic, "Identification of Tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development", Nature Reviews, vol. 2, julio de 2002, pp. 1 a 7; J.H. Kessler, C.J.M. Melief, "Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy", Leukemia (2007), 21, 1859-1874; o en el sito web de la base de datos de péptidos/inmunidad del cáncer: [http://www.cancerimmunity.org/peptide database/tumorspecific.htm](http://www.cancerimmunity.org/peptide_database/tumorspecific.htm).

Los ejemplos de epitopos de células T no peptídicos incluyen, de forma notable:

- fragmentos del polisacárido neumocócico de tipo 4, y conjugados del toxoide del tétanos y oligosacáridos, según se describe en C.C.A.M. Peeters (1991), en The Journal of Immunology, 146, 4309-4314,
- 35 - liposacáridos meningocócicos, según se describe en A.F.M. Verheul (1991), en Detection and Immunity, vol. 59, n.º 10, pp. 3566-3573.

Epitopos de células B

Tal como se emplea en la presente, un epitopo de células B significa un antígeno capaz de inducir una respuesta de células B.

- 40 Tal como se emplea en la presente, un carbohidrato significa un sacárido, de forma notable mono-, di-, oligo y polisacáridos.

En un aspecto preferido, el resto carbohidrato (b) que forma el epitopo de células B del conjugado de fórmula (I) es un resto N-acetilgalactopiranosilo, o uno de sus derivados.

- 45 En un aspecto concreto, el resto carbohidrato (b) está unido a un resto aminoácido, péptido o lípido. En otro aspecto, el resto carbohidrato es un péptido o aminoácido de O-glicosilo. En otro aspecto, el epitopo de células B está unido a la estructura dendrímica M(T)_n a través de dicho aminoácido o péptido.

El epitopo de células B puede comprender uno o más restos carbohidrato (b), de forma notable de 1 a 10, en particular de 1 a 6 restos carbohidrato.

Este epitopo de células B puede seleccionarse de antígenos glicosídicos de tumores (cánceres), de forma notable de:

- 5 - la clase de los glicolípidos, que incluyen glicolípidos ácidos, tales como, por ejemplo, gangliósidos GD2, GD3 y GM3 (melanoma), y glicolípidos neutros, tales como, por ejemplo, los antígenos Lewisy (Ley) (mama, próstata, ovario) y Globo H (mama, próstata, ovario);
- 10 - la clase de péptidos (o aminoácidos) de O-glicosilo, tales como, por ejemplo, el antígeno Tn (α -GalNAc-Ser o α -GalNAc-Thr), antígeno TF (β -Gal-(1-3)- α -GalNAc-Ser o β -Gal-(1-3)- α -GalNAc-Thr), dos marcadores tumorales que con frecuencia están presentes en carcinomas, pero habitualmente no en tejidos normales [Springer G. F., Science, 224, 1198-1206 (1984)] (ovario, mama, pulmón), o di-Tn (α -GalNAc-Ser/Thr)₂, tri-Tn (α -GalNAc-Ser/Thr)₃ o hexa-Tn (α -GalNAc-Ser/Thr)₆.

15 El epitopo de células B del conjugado según la presente invención también puede originarse de polisacáridos bacterianos capsulares, por ejemplo, de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, y del grupo de *Streptococcus*.

Los polisacáridos son restos carbohidrato obtenidos mediante un proceso sintético.

El epitopo de células B del presente conjugado también puede ser de origen fúngico, por ejemplo, aislado a partir de la levadura *Saccharomyces*.

20 En un aspecto preferido, los epitopos de células B del conjugado de fórmula (I) son preferentemente marcadores tumorales, tales como, por ejemplo, los antígenos Tn y TF.

Pueden seleccionarse del grupo que comprende los antígenos Tn, di-Tn, tri-Tn (Tn3), hexa-Tn (Tn6), o TF.

En otro aspecto, B es o comprende los restos carbohidrato seleccionados del grupo que consiste en:

- α -GalNAc,
- α -GalNAc-Ser,

25

- α -GalNAc-Thr,
- β -GalNAc,
- β GalNAc-Ser,
- β -GalNAc-Thr,
- β -Gal-(1-3)- α -GalNAc-Ser,

30

- β -Gal-(1-3)- α -GalNAc-Thr,
- (α -GalNAc-Ser/Thr)₂,
- (α -GaiNAc-Ser/Thr)₃, y
- (α -GalNAc-Ser/Thr)₆.

35 En un aspecto preferido, B es o comprende el resto (α -GalNAc-Ser/Thr)₃, lo más preferiblemente (α -GalNAc)Ser-(α -GalNAc)Thr-(α -GalNAc)Thr.

En otra realización preferida, el conjugado de fórmula (I) es MAG-Tn3.

Etapa 1)

40 El método según la presente invención comprende la etapa i) de acoplar un epitopo de células B que contiene carbohidratos protegido (B_{Pr}), cuyos grupos hidroxilo del resto carbohidrato (b) están protegidos con un grupo protector (Pr), con un compuesto M(T)_n, formando con ello un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos M(T- B_{Pr})_n, seleccionándose dicho grupo protector (Pr) del grupo que consiste en alilo, *p*-metoxibencilo (PMB), *t*-butildimetilsililo (TBDMS), benciloximetilo (BOM), levulinilo (Lev), benzoílo (Bz), 2,5-difluorobenzoílo, cloroacetilo, bencilo (Bn) o un acetilo (Ac), o formando, con los dos grupos hidroxilo a los cuales está unido, un isopropilidén cetral C₅-C₆ o un alquilcarbonato cíclico C₅-C₆.

En un aspecto preferido, Pr es bencilo (Bn) o acetilo (Ac).

En un aspecto concreto, la etapa i) comprende las etapas de:

- 5 a) acoplar un primer resto carbohidrato protegido (b_{Pr}), cuyos grupos hidroxilo están protegidos con un grupo protector (Pr), notablemente seleccionado de bencilo (Bn) o acetilo (Ac), con un compuesto $M(T)_n$, formando con ello un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos $M(T-b_{Pr})_n$; y, opcionalmente,
- b) repetir la etapa a) con más restos carbohidrato protegidos (b_{Pr}) hasta obtener un conjugado de carbohidrato protegido de fórmula (II) $M(T-B_{Pr})_n$.

10 De forma ventajosa, se ha demostrado que dichos grupos protectores Pr permiten controlar el acoplamiento de cada uno de los restos carbohidrato b, o del epitopo B de células B, con $M(T)_n$ en la etapa i). Además, se ha demostrado que estos grupos protectores permiten obtener el producto deseado, con un mejor compromiso entre rendimiento y pureza.

Los grupos hidroxilo del resto carbohidrato pueden protegerse mediante los grupos protectores mencionados anteriormente (Pr), de forma notable con grupos bencilo o acetilo, según métodos convencionales.

15 Los epitopos de células B protegidos B_{Pr} , o los restos carbohidrato protegidos (b_{Pr}) están disponibles en el mercado o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles en el mercado y/o según métodos convencionales.

En un aspecto preferido, el núcleo de polilisina dendrimérico M y, así, el posterior bloque constituyente $M(T)_n$, se inmoviliza sobre un soporte sólido, permitiendo así una síntesis peptídica en fase sólida iterativa.

20 Como ejemplo de soporte sólido, se puede mencionar una resina de poliestireno funcionalizada con alcohol *p*-benciloxibencílico (resina de Wang), sobre la cual pueden injertarse después grupos Fmoc- β -Ala-, o las comercializadas con el nombre comercial Fmoc- β -Ala-TentaGel R Trt. El núcleo M puede estar unido, de forma notable, a través de un resto β -Ala-OH. La proporción de sustitución de la resina, es decir, la proporción de injerto de la resina con grupos Fmoc- β -Ala-, puede variar de 0,2 a 0,05 mmol/g, preferiblemente de 0,10 a 0,13 mmol/g.

25 En un aspecto concreto, b_{Pr} es un péptido o aminoácido de O-glicosilo protegido. El péptido de O-glicosilo protegido puede estar acoplado al bloque constituyente $M(T)_n$ introduciendo sucesivamente los restos aminoácidos de O-glicosilo constitutivos protegidos b_{Pr} .

A este respecto, la síntesis peptídica y glicopeptídica en fase sólida puede realizarse empleando el protocolo de la química de Fmoc convencional [5] y [6]. Los aminoácidos y los aminoácidos o péptidos glicosilados N- α -Fmoc se incorporan uno a uno a la cadena peptídica.

30 Así, la etapa i) puede realizarse haciendo reaccionar un primer aminoácido de O-glicosilo protegido con N- α -Fmoc b_{Pr} con el bloque constituyente $M(T)_n$. De modo más específico, el grupo carboxílico (COOH) del primer aminoácido de O-glicosilo b_{Pr} se hace reaccionar con el extremo NH_2 de cada una de las ramificaciones T, formando con ello un enlace covalente peptídico (-C(=O)NH-).

35 El Fmoc se escinde, por ejemplo, en presencia de 20% de piperidina en DMF o NMP. Después, un segundo aminoácido de O-glicosilo protegido con N- α -Fmoc b_{Pr} puede hacerse reaccionar de modo similar con el grupo NH_2 del primer resto aminoácido protegido, etc.

Así, cuando el epitopo de células B comprende varios restos carbohidrato (b), la etapa i) del método según la invención puede comprender la etapa de repetir el acoplamiento según la etapa a) hasta obtener el conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos $M(T-B_{Pr})_n$.

40 Este acoplamiento peptídico puede realizarse en un disolvente aprótico polar, tal como DMF o NMP, en presencia de reactivos de acoplamiento, tales como HATU y DIPEA o DIC/HOBt, y PyBOP.

Etapas ii)

En un aspecto concreto, Pr es bencilo. En este caso, la etapa de desprotección ii) puede realizarse en presencia de TFOH o mediante una hidrogenación catalítica.

En un aspecto concreto, la etapa ii) es una hidrogenación catalítica.

45 En un aspecto preferido, la hidrogenación catalítica se realiza en presencia de Pd/C, de forma notable de Pd al 10%/C (% en p/p), como catalizador. La proporción en peso del conjugado de fórmula (II)/catalizador puede variar de 10/2 a 10/10, y preferiblemente es de aproximadamente 10/8. El catalizador puede añadirse de modo discontinuo a lo largo de un periodo de tiempo largo.

50 La hidrogenación catalítica se realiza preferiblemente en NMP/H₂O, de forma notable en una proporción en volumen de 8,75/12,5, como disolvente.

La hidrogenación catalítica se realiza preferiblemente a una temperatura que varía de 20 °C a 40 °C, en particular a aproximadamente 37 °C.

La hidrogenación catalítica se realiza preferiblemente bajo una presión que varía de 1 a 10 bares, más preferiblemente a aproximadamente 5 bares.

5 En otro aspecto, la etapa ii) se realiza en presencia de TfOH.

Preferiblemente, el conjugado de fórmula (II) se hace reaccionar con TfOH, en presencia de TFA, DMS y *m*-cresol. La proporción relativa de TfOH/TFA/DMF/*m*-cresol puede ser de 1/5/3/1 en v/v/v/v.

En otro aspecto, el grupo protector Pr es acetilo.

10 La desprotección de los grupos protectores de acetilo en la etapa ii) se realiza preferiblemente en presencia de hidrazina, en un disolvente polar prótico, por ejemplo, un alcohol, tal como metanol. Esta reacción puede realizarse a temperatura ambiente, es decir, entre 15 °C y 25 °C.

La proporción molar de hidrazina con relación al compuesto de fórmula (II) puede variar de 100 a 1500 equivalentes molares.

15 La desprotección del acetilo puede realizarse, como alternativa, en presencia de MeONa, de forma notable en MeOH como disolvente, a temperatura ambiente, es decir, entre 15 °C y 25 °C.

En un aspecto concreto, cuando está inmovilizado sobre un soporte sólido, el conjugado de fórmula (II) obtenido al final de la etapa i) se escinde preliminarmente del soporte sólido, antes de realizar la etapa de desprotección ii). Esta escisión puede realizarse en presencia de TFA y TIS en agua, por ejemplo, con la siguiente proporción en volumen 95/2,5/2,5 en v/v/v.

20 *Etapa iii)*

El método puede comprender también una etapa iii), posterior a la etapa ii), que consiste en una o más etapas de purificación, de forma notable mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC).

Etapa iv)

El método puede comprender también una etapa iv) posterior de recuperación del producto.

25 *Síntesis de M(T)_n*

En un aspecto concreto, el método comprende también la etapa de preparar el conjugado M(T)_n.

En una realización concreta, el conjugado M(T)_n se prepara comenzando a partir del núcleo de polilisina dendrimérico e introduciendo, uno a uno, los restos aminoácidos N-prottegidos que constituyen el epitopo de células T peptídico. Los restos aminoácidos N-prottegidos son, de forma notable, restos aminoácidos Fmoc.

30 Los acoplamientos de aminoácidos pueden realizarse en un disolvente aprótico polar, tal como DMF, en presencia de uno o más reactivos de acoplamiento, tales como DIC, HOBt, PyBOP, HATU o DIPEA. Se prefieren particularmente las combinaciones (DIC/HOBt y PyBOP o, como alternativa, HATU/DIPEA). También se describen reactivos de acoplamiento alternativos en E. Valeur; M. Bradley, Chem. Soc. Rev. (2009), 38, 606; A. El-Faham et al., Chem. Eur. J. (2009), 15, 9404; o R. Subiros-Funosas et al., Org. Biomol. Chem., (2010) 8, 3665.

35 Después de cada acoplamiento peptídico, los grupos protectores de N-aminoácidos se retiran. Como ejemplo, los grupos protectores Fmoc pueden retirarse en presencia de piperidina en un disolvente aprótico polar, tal como DMF.

Con respecto a la síntesis del fragmento peptídico de SEQ ID NO:1, los restos aminoácidos AA⁹⁻¹⁰ y AA¹⁵⁻¹⁶ pueden incorporarse como dipéptidos de pseudoprolina. De modo ventajoso, la incorporación de dichos dipéptidos muestra un impacto significativo sobre la calidad bruta del producto.

40 *Síntesis de M*

En un aspecto concreto, el método comprende también la etapa de preparar el núcleo de polilisina dendrimérico M.

El núcleo de polilisina dendrimérico M puede prepararse según el método descrito en la patente de EEUU n.º 6.676.946.

Conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos M(T-B)_n

45 En otro aspecto, la presente descripción proporciona, de modo ventajoso, un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos M(T-B)_n que tiene un grado de pureza ≥ 95%, que puede obtenerse según el método de la invención.

Este grado de pureza puede obtenerse realizando una etapa de purificación (iii) después de la etapa (ii), de forma notable, una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). Como ejemplo, una RP-HPLC puede realizarse con una columna de baja granulometría, de forma notable que tenga una granulometría menor que 15 μm , de forma notable de aproximadamente 10 μm o menor que 5 μm y/o que tenga un tamaño de poro de aproximadamente 300 Å o menor, de forma notable menor que 200 Å, en particular menor que 100 Å. La fase estacionaria puede ser una fase inversa basada en gel de sílice injertado con grupos octadecilo (también denominado sílice C18). La elución puede realizarse con agua (TFA al 0,1%)/acetonitrilo con un gradiente somero, por ejemplo, de 70/30 a 60/40, a lo largo de un periodo de aproximadamente 20 minutos.

El grado de pureza del conjugado de fórmula (I) puede determinarse mediante cualquier método convencional, de forma notable mediante RP-HPLC.

La pureza es preferiblemente $\geq 96\%$, de forma notable $\geq 98\%$, y de forma ventajosa $\geq 99\%$.

Conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos $M(T-B_{Pr})_n$

En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos de fórmula (II):

15
$$M(T-B_{Pr})_n \quad (II)$$

en la que:

- M es un núcleo de polilisina dendrimérico;

- T es un epitopo de células T, que comprende preferiblemente un resto peptídico;

20 - B_{Pr} es un epitopo de células B que contiene carbohidratos protegido, que comprende al menos un resto carbohidrato (b), cuyos grupos hidroxilo están protegidos con un grupo Pr, seleccionándose dicho grupo Pr del grupo que consiste en alilo, *p*-metoxibencilo (PMB), *t*-butildimetilsililo (TBDMS), benciloximetilo (BOM), levulinilo (Lev), benzoilo (Bz), 2,5-difluorobenzoilo, cloroacetilo, bencilo (Bn) o un acetilo (Ac), o formando, con los dos grupos hidroxilo a los cuales está unido, un isopropilidén cetal C_5-C_6 o un alquilcarbonato cíclico C_5-C_6 ; y

- n es un número entero y representa el número de grupos -T-B unidos covalentemente a M.

25 En un aspecto concreto, B_{Pr} es un (α -GalNAc-Ser/Thr)₃ protegido.

En otro aspecto, Pr es bencilo o acetilo.

En otro aspecto, M es HO- β Ala-K(K)₂.

En otro aspecto, T es QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:1).

30 En otro objeto, la invención proporciona el uso de un conjugado de carbohidrato y péptido $M(T-B_{Pr})_n$ para preparar un conjugado de carbohidrato y péptido $M(T-B)_n$, siendo $M(T-B_{Pr})_n$ y $M(T-B)_n$ como se definió anteriormente.

Otras características de la invención serán evidentes en el transcurso de las siguientes descripciones de ejemplos de realizaciones. Estos ejemplos se ofrecen como ilustración de la invención y no pretenden limitarla.

Figuras

35 Figura 1: Síntesis de MAG-Tn3 según el protocolo A del método de la invención. Los equivalentes molares se indican con relación al grupo amino. Los AA⁹⁻¹⁰ y AA¹⁵⁻¹⁶ se incorporan como dipéptidos de pseudo-Pro.

Figura 2: Síntesis de MAG-Tn3 según el protocolo B del método de la invención. Los equivalentes molares se indican con relación al grupo amino. Los AA⁹⁻¹⁰ y AA¹⁵⁻¹⁶ se incorporan como dipéptidos de pseudo-Pro.

Abreviaturas

AA: aminoácido

40 Ac: acetilo

AcOH: ácido acético

Bn: bencilo

Boc: terc-butoxicarbonilo

tBu: terc-butilo

- DIC: N,N'-diisopropilcarbodiimida
 DIPEA: diisopropiletilamina
 DIPE: éter diisopropílico
 DMAP: 4-dimetilaminopiridina
 5 DMF: dimetilformamida
 DMS: dimetilsulfuro
 DVB: divinilbenceno
 EtOH: etanol
 FA: ácido fórmico
 10 Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo
 HATU: hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
 HOBt: N-hidroxibenzotriazol
 HPLC/MS: cromatografía líquida de alta resolución/espectroscopía de masas
 MAG: glicopéptido de antígeno múltiple
 15 MeOH: metanol
 MeONa: metilato de sodio
 ESMS: espectrometría de masas de electronebulización
 PM: peso molecular
 NMP: N-metilpirrolidona
 20 RMN: resonancia magnética nuclear
 PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidinofosfonio
 RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa
 TA: temperatura ambiente
 SELDI-TOF MS: espectrometría de masas en tiempo de vuelo mediante desorción/ionización de láser de superficie
 25 potenciada
 TBS: terc-butildimetilsililo
 TFA: ácido trifluoroacético
 TfOH: ácido trifluorometansulfónico
 THF: tetrahidrofurano
 30 TIS: triisopropilsilano
 TMSBr: bromuro de trimetilsililo
 Trt: tritilo

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de MAG-Tn3 a través del protocolo A y B

35 *Métodos generales*

La síntesis de **6** se realizó de modo discontinuo en fase sólida empleando la química de Fmoc. Los grupos protectores de cadenas laterales de aminoácidos empleados fueron Trt sobre Gln y Asn, Boc sobre Lys⁷ y Lysⁿ, tBu sobre Tyr, Ser y Thr, OtBu sobre Glu. Para Lys¹⁹ y Lys²⁰, los grupos protectores fueron Fmoc.

Se determinó el contenido neto en péptidos mediante un análisis de nitrógeno o un análisis de aminoácidos cuantitativo empleando un analizador Beckman 6300 después de la hidrólisis de los compuestos con HCl 6 N a 110 °C durante 20 h.

5 Los análisis de HPLC/MS se realizaron en un sistema Alliance 2695 acoplado a un detector de UV 2487 (220 nm) y a un espectrómetro Q-Tofmicro™ (Micromass) con una fuente de ionización de electronebulización (modo positivo) (Waters). Las muestras se enfriaron hasta 4 °C en el muestreador automático. Se realizó un gradiente lineal con acetonitrilo + FA al 0,025% (A)/agua + TFA al 0,04% + FA al 0,05% (B) a lo largo de 20 min. La columna era Zorbax 300SB C18 (3,5 μ, 3 x 150 mm) (Agilent) (gradiente A al 13-53%) o XBridge™ BEH130 C18 (3,5 μ, 2,1 x 150 mm) (Waters) (gradiente A al 15-40%). La temperatura de la fuente se mantuvo a 120 °C y la temperatura de desolvatación a 400 °C. El voltaje de cono era de 40 V.

10 Los análisis de ESMS se registraron en el modo positivo mediante infusión directa en el mismo espectrómetro de masas. Las muestras se disolvieron a una concentración de aproximadamente 5 μM en agua/acetonitrilo (1/1) con ácido fórmico al 0,1%.

15 Los análisis de SELDI-TOF se realizaron en un espectrómetro de masas PCS 4000 (Bio-Rad Labs). Las superficies de la matriz H4 ProteinChip se activaron con 1 μl de CH₃CN. Las manchas se incubaron con la mezcla de reacción (2,5 μl, 1 mg/ml) en una caja a TA durante 20 min. Después se lavaron con el tampón de reacción (3 x 1 min) y H₂O (3 x 1 min). La matriz (2 x 6,0 μl de ácido sinapínico saturado en CH₃CH al 50%/TFA al 0,5%) se aplicó a cada mancha y se dejó secar al aire. Se generaron espectros de cada mancha de la matriz con un láser ajustado a aproximadamente 3 μJ. El instrumento se calibró externamente con ubiquitina bovina, citocromo C bovino, β-lactoglobulina, con la matriz y los ajustes según se describió anteriormente.

20 La pureza de **6** se analizó mediante RP-HPLC empleando un sistema de bomba Agilent 1200 con un detector de UV a 220 nm. La columna era Zorbax 300SB C18 (3,5 μ, 3 x 150 mm) (Agilent) y el gradiente se realizó con acetonitrilo + TFA al 0,1% (A)/agua + TFA al 0,1% (B) a lo largo de 40 min, A del 13% al 53% (0,8 ml/min, tiempo de retención 20,5 min).

25 Los equivalentes molares de todos los reactivos se indican con relación a los grupos amino. Las cantidades molares de los intermedios protegidos **4** y **5** se calculan basando en la sustitución de la resina-Fmoc-β-Ala **1** de partida. Los rendimientos globales (tabla) incluyen todas las etapas sintéticas desde **1**. Se calcularon sobre el contenido neto en péptidos del producto final **6** desde la sustitución de la resina-Fmoc-β-Ala **1**.

Protocolo A (figura 1)

30 **Resina-Fmoc-β-Ala (resina con grado bajo de sustitución) 1**

Se sumergieron 2 g de resina de alcohol *p*-benciloxibencílico (resina de Wang, 0,91 mmol/g, malla 100-200, matriz polimérica: copoli(estireno-DVB al 1%), Novabiochem) en DMF (Applied Biosystems) durante 1 h en un matraz de fondo redondo seco. Se disolvieron 311 mg (1 mmol) de Fmoc-β-Ala-OH seco (Novabiochem, Merck Chemicals Ltd) en 8 ml de CH₂Cl₂ anhidro (Acros). Se añadieron cuatro gotas de DMF para completar la disolución. Después de la adición de 77 μl (0,5 mmol) de DIC (Fluka), la mezcla de reacción se agitó durante 20 min bajo una atmósfera de argón, a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad y el evaporador rotatorio se abrió bajo una atmósfera de argón. El residuo se disolvió en el volumen mínimo de DMF (6 ml) y la disolución se añadió a la resina. Se añadieron 6 mg (0,05 mmol) de DMAP (Acros) disueltos en 0,5 ml de DMF y la suspensión se agitó suavemente durante 2 h a temperatura ambiente.

40 La tasa de sustitución de la resina se midió mediante un análisis de UV de una muestra de resina según el siguiente procedimiento. Se trasladaron de 2 a 6 mg de la resina con una pipeta Pasteur a un pequeño embudo de vidrio sinterizado. La resina se lavó con DMF, CH₂Cl₂ (Carlo Erba) y se secó. La resina se trasladó a una célula de UV, se pesó con precisión y después se le añadió 2,8 ml de piperidina al 20% (Aldrich) en DMF. La suspensión se agitó con la ayuda de una pipeta Pasteur durante 2 min. La absorbancia se leyó a 300,5 nm ($\epsilon = 7800$), conteniendo la célula de referencia piperidina al 20% en DMF. Se descubrió que el grado de carga era de 0,1 mmol/g.

45 La resina se lavó tres veces con DMF. Se introdujo un casquete en los grupos hidroxilo residuales empleando el siguiente protocolo. La resina se resuspendió en 13 ml de DMF. Se añadieron 1,55 ml (16,4 mmol) de Ac₂O (Sigma) en 1 ml de DMF, y después 660 mg (5,41 mmol) de DMAP en 1 ml de DMF. Después de agitar suavemente durante 30 min a temperatura ambiente, la suspensión se filtró en un embudo de vidrio sinterizado, se lavó sucesivamente tres veces con DMF, tres veces con CH₂Cl₂, y después se secó durante la noche en un secador. La resina **1** se conservó a 4 °C.

50 **Resina-[QYIKANSKFIGITEL]₄-K₂-K-β-Ala (péptido protegido) 2**

55 El péptido tetravalente se sintetizó a partir de 250 mg (25 μmmol) de la resina-Fmoc-β-Ala **1** en un sintetizador peptídico Applied Biosystems 433A empleando al química de Fmoc. Se siguió el protocolo de síntesis convencional de Applied, excepto por una etapa de lavado adicional después de cada etapa de acoplamiento. Brevemente, los

grupos Fmoc se retiraron con piperidina al 22% en NMP (Applied Biosystems) y la desprotección se controló mediante la conductividad. Se construyó el núcleo de lisina acoplado sucesivamente dos niveles de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (Applied Biosystems) (1^{er} ciclo: 40 eq., 2^o ciclo: 20 eq.) empleando HATU (Applied Biosystems) (1^{er} ciclo: 40 eq., 2^o ciclo: 20 eq.)/DIPEA (Applied Biosystems) (1^{er} ciclo: 80 eq., 2^o ciclo: 40 eq.) como reactivos de acoplamiento, y NMP como disolvente (nota: el uso de este gran exceso de reactivo no debería ser necesario para la eficacia de la reacción y solo es debido al hecho de que los cartuchos precargados estaban rellenos con 1 ml de aminoácido). Se realizó la introducción uno a uno de los posteriores aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, 10 eq./amina) que portan grupos protectores de cadenas laterales convencionales, con HATU (10 eq./amina)/DIPEA (20 eq./amina) en NMP. Los AA en las posiciones 15-16 y 9-10 se incorporaron, respectivamente, como Fmoc-Ile-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH y Fmoc-Asn(Trt)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (10 eq./amina) (Novabiochem, Merck Chemicals Ltd) con HATU (10 eq./amina) y DIPEA (20 eq./amina).

[S(α -D-GalNAc(OBn)₃)-T(α -D-GalNAc(OBn)₃)-T(α -D-GalNAc(OBn)₃)-QYIKANSKFIGITEL]₄-K₂-K- β -Ala **5**

Comenzando a partir de **2** (25 μ mol), los bloques constituyentes glicosilados se incorporaron a mano: Fmoc-T(α -D-GalNAc(OBn)₃)-OH (Ficher Chemicals AG) (1^{er} ciclo), Fmoc-T(α -D-GalNAc(OBn)₃)-OH (2^o ciclo) y Fmoc-S(α -D-GalNAc(OBn)₃)-OH (Ficher Chemicals AG) (3^{er} ciclo). Brevemente, el bloque constituyente seco (0,3 mmol, 3 eq./grupo amino libre) se disolvió en la cantidad mínima de DMF (aproximadamente 2 ml). Se añadió una disolución de 55 mg (0,145 mmol) de HATU (Novabiochem) en 0,5 ml de DMF, y la mezcla resultante se añadió a la resina. Después de añadir 52 μ l (0,3 mmol) de DIPEA (Aldrich), la suspensión se agitó de modo mecánico. Las tres etapas de acoplamiento se controlaron mediante el ensayo de Kaiser [1] y se completaron, respectivamente, en 1 h, 1 h y 1 h. Después de cada etapa de acoplamiento, la resina se lavó con DMF (cuatro veces). Todas las escisiones del Fmoc se realizaron mediante el tratamiento de la resina con piperidina al 20% en DMF. Después de cada desprotección, la resina se lavó sucesivamente con DMF (seis veces), CH₂Cl₂ (seis veces) y DMF (seis veces). Al final de la síntesis, la resina se lavó a fondo con DMF y CH₂Cl₂, y se secó en un secador. Se añadieron 10 ml de TFA (Applied Biosystems)/agua/TIS (Acros) (95/2,5/2,5 en v/v/v) a la resina a 4 °C y la mezcla se agitó durante 1 h y 30 min a temperatura ambiente. Después de la filtración de la resina, la disolución se concentró y el producto bruto precipitó con éter dietílico. Después de una centrifugación, el sedimento se disolvió en agua y se liofilizó para producir 229 mg del glicopéptido bruto **5**.

[S(α -D-GalNAc)-T(α -D-GalNAc)-T(α -D-GalNAc)-QYIKANSKFIGITEL]₄-K₂-K- β -Ala o MAG-Tn3 **6**

A partir de **5**.

30 - Con TfOH [2-4].

Se disolvieron 200 mg (0,014 mmol) de **5** en 2,96 ml de TFA, 1,78 ml de DMS (Sigma-Aldrich) y 587 μ l de metacresol (Sigma-Aldrich) a TA. La disolución se enfrió hasta -10 °C y se añadieron 587 μ l de TfOH (Fluka) y la mezcla se agitó durante 1 h y 15 min a -10 °C (TfOH/TFA/DMS/*m*-cresol 1/5/3/1 en v/v/v/v). El producto precipitó con éter dietílico y, después de una centrifugación, el sedimento se disolvió en agua y se liofilizó para producir 372 mg del glicopéptido bruto. El producto se disolvió en 7,7 ml de tampón acetato de amonio 0,05 M y el pH se ajustó a 7 con amoniaco 1 M. Después de 1 h a temperatura ambiente, la disolución se liofilizó para producir 412 mg del producto bruto. El producto se purificó mediante RP-HPLC empleando un sistema de bomba Agilent 1200 con un detector de UV a 230 nm. La columna era Zorbax C18 (5 μ , 300 Å, 9,4 x 250 mm) (Agilent) y se realizó un gradiente con agua (TFA al 0,1%)/acetonitrilo a lo largo de 20 min, desde 73/27 a 60/40. La purificación produjo 3,9 mg (contenido neto en péptidos) de **6** con una pureza del 95,90%. El rendimiento global fue de 1,6%.

Protocolo B (figura 2)

Resina-[QYIKANSKFIGITEL]₄-K₂-K- β -Ala (péptido protegido) **2**

Hasta la incorporación de Tyr⁵, el péptido tetravalente se sintetizó a partir de 36,9 g (4,8 mmol) de la resina Fmoc- β -Ala-Tentagel R Trt **1** (0,13 mmol/g) (Rapp Polymere) en un sintetizador peptídico manual equipado con un reactor Schmizo. Antes del proceso de alargamiento, la resina se sumergió en DMF durante 2 a 3 horas y se lavó con 240 ml de DMF (tres veces, 2 min/ciclo). Después de cada acoplamiento, los grupos Fmoc se retiraron con piperidina al 20% en 240 ml de DMF (tres etapas, 20 min cada una). En el caso de Glu¹⁷, Asn⁹ y Gln⁴, se añadió HOBt al 2% a la disolución de desprotección. Después de cada desprotección, la resina se lavó sucesivamente con 240 ml de DMF (4 veces, 2 min/ciclo), 240 ml de HOBt al 2% en DMF (dos veces, 5 min/ciclo) y 240 ml de DMF (dos veces, 2 min/ciclo)

Los acoplamientos de aminoácidos (de 1,5 a 2 eq./amina) se realizaron en DMF (111 ml) a temperatura ambiente con DIC/HOBt (de 1,5 a 2 eq. cada uno/amina) (véanse los detalles que aparecen a continuación). Los AA en las posiciones 15-16 y 9-10 se incorporaron, respectivamente, como Fmoc-Ile-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH y Fmoc-Asn(Trt)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH. Después de 30 min, se añadió una porción fresca de DIC (de 1,5 a 2 eq.) a la mezcla de reacción. Las etapas de acoplamiento se controlaron mediante el ensayo de Kaiser [1]. De Leu¹⁸ a Ser¹, después de 1 h de acoplamiento con DIC/HOBt (en la misma cantidad), se añadió reactivo PyBOP (véanse los detalles que aparecen a continuación) y el pH se ajustó a 7 mediante la adición gota a gota de DIPEA. Después de 30 min, la

5 resina se lavó con 240 ml de DMF (5 veces, 2 min/ciclo) y se realizó una etapa de acetilación de Leu¹⁸ a Thr². La acetilación se realizó a temperatura ambiente con anhídrido acético (1 eq./amina) en presencia de piridina (1 eq./amina) en 111 ml de DMF. Después de 20 min, la resina se lavó con 240 ml de DMF (6 veces, 2 min/ciclo). Después de la incorporación de Tyr⁵, la resina se lavó a fondo con 240 ml de DMF (8 veces, 2 min/ciclo) y 240 ml de CH₂Cl₂ (8 veces, 2 min/ciclo), antes de secar.

Después de la incorporación de Tyr⁵, se realizó el ensamblaje a una escala de 0,15 mmol o a una escala de 4,65 mmol empleando los mismos protocolos, y se obtuvo la resina-péptido 2 para, respectivamente, 4 y 5.

Aminoácidos (eq./amina, mmol)	DIC/HOBt 1/1 (eq./amina, mmol)	Reacción de acoplamiento (min)	PyBOP (eq./amina)
20. Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (1,75, 2,1)	1,75, 2,1	60	0,5
19. Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (2, 4,8)	2, 4,8	105	1
18. Fmoc-Leu-OH (2, 9,6)	2, 9,6	60	1
17. Fmoc-Glu(OtBu) (2, 9,6)	2, 9,6	60	1
16-15. Fmoc-Ile-Thr(Ψ ^{Me,Me} pro)-OH (1,5, 7,2)	1,5, 7,2	60	0,5
14. Fmoc-Gly-OH (2, 9,6)	2, 9,6	60	1
13. Fmoc-Ile-OH (2, 9,6)	2, 9,6	60	1
12. Fmoc-Phe-OH (2, 9,6)	2, 9,6	60	1
11. Fmoc-Lys(Boc)-OH (2 eq., 9,6 mmol)	2, 9,6	60	1
10-9. Fmoc-Asn(Trt)-Ser(Ψ ^{Me,Me} pro)-OH (1,5, 7,2)	1,5, 7,2	60	0,5
8. Fmoc-Ala-OH (2, 9,6)	2, 9,6	60	1
7. Fmoc-Lys(Boc)-OH (2, 9,6)	2, 9,6	60	1
6. Fmoc-Ile-OH (2, 9,6)	2, 9,6	60	1
5. Fmoc-Tyr(tBu)-OH (2, 9,6)	2, 9,6	60	1
4. Fmoc-Gln(Trt)-OH (2, 1,2 para <u>4</u>) o (2, 37,2 para <u>5</u>)	(2, 1,2) o (2, 37,2)	60	1

[S(α-D-GalNAc(OAc)₃)-T(α-D-GalNAc(OAc)₃)-T(α-D-GalNAc(OAc)₃)-QYIKANSKFIGITEL]₄-K₂-K-β-Ala 4

10 La síntesis se realizó a partir de 2 (0,15 mmol) tal como se ha descrito anteriormente para 2. Las etapas de acoplamiento se realizaron con los siguientes bloques constituyentes de AA [5] y reactivos.

Aminoácidos (eq./amina, mmol)	DIC/HOBt 1/1 (eq./amina, mmol)	Reacción de acoplamiento (min)	PyBOP (eq./amina)
3. Fmoc-Thr(α-D-GalNAc(OAc) ₃)-OH (1,5, 0,9)	1,5, 0,9	60	0,5
2. Fmoc-Thr(α-D-GalNAc(OAc) ₃)-OH (1,5, 0,9)	1,5, 0,9	60	0,5
1. Fmoc-Ser(α-D-GalNAc(OAc) ₃)-OH (1,5, 0,9)	1,5, 0,9	60	0,5

15 Al final de la síntesis, la resina-glicopéptido (0,15 mmol) se suspendió en TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5 en v/v/v) (10 ml/de resina-glicopéptido) y se agitó durante 1 h a 20 °C ± 2 °C. Después de una filtración, la resina se lavó dos veces con la misma mezcla de TFA (2 ml/g de resina-glicopéptido por lavado). Los filtrados y los lavados se reunieron y se agitaron durante 30 min más a 20 °C ± 2 °C. Después de una concentración (temperatura del baño ≤ 35 °C), el producto bruto se precipitó con DIPE (aproximadamente 35 ml/g de resina-glicopéptido). Después de una filtración y un lavado con DIPE, el sólido se secó (t ≤ 30 °C) y se obtuvieron 750 mg de 4 bruto.

ESMS: 12409,589 (C₅₅₃N₈₅₅N₁₀₇O₁₂₃ calc. 12410,465).

[S(α -D-GalNAc(OBn)₃)-T(α -D-GalNAc(OBn)₃)-T(α -D-GalNAc(OBn)₃)-QYIKANSKFIGITEL]₄-K₂-K- β -Ala 5

La síntesis se realizó a partir de 2 (4,65 mmol) tal como se ha descrito anteriormente para 2. Las etapas de acoplamiento se realizaron con los siguientes bloques constituyentes de AA (Ficher Chemicals AG) y reactivos. Al final de la síntesis se obtuvieron 84,87 g de la resina-glicopéptido.

Aminoácidos (eq./amina, mmol)	DIC/HOBt (eq./amina, mmol)	1/1	Reacción de acoplamiento (min)	PyBOP (eq./amina)
3. Fmoc-Thr(α -D-GalNAc(OBn) ₃)-OH (1,5, 27,9)	1,5, 27,9		60	0,5
2. Fmoc-Thr(α -D-GalNAc(OBn) ₃)-OH (1,5, 27,9)	1,5, 27,9		60	0,5
1. Fmoc-Ser(α -D-GalNAc(OBn) ₃)-OH (1,5, 27,9)	1,5, 27,9		60	0,5

5 La resina-glicopéptido (20 g, 1,096 mmol) se trató como se ha descrito anteriormente para 4 y se obtuvieron 9,95 g de 5 bruto.

ESMS: 14141,433 (C₇₃₃N₉₉₉N₁₀₇O₁₇₇ calc. 14141,610).

10 Nota: Este protocolo produjo un compuesto bruto comparable al obtenido según el protocolo A, es decir, comenzando a partir de la resina de Fmoc- β -Ala-*p*-benciloxibencil alcohol (resina de Wang) (véase anteriormente).

[S(α -D-GalNAc(OH)₃)-T(α -D-GalNAc(OH)₃)-T(α -D-GalNAc(OH)₃)-QYIKANSKFIGITEL]₄-K₂-K- β -Ala o MAG-Tn3 6

A partir de 4.

- Con hidrazina [7].

15 Se disolvieron 100 mg (20 μ mol) de 4 en 2,2 ml de MeOH. Se añadieron 567 μ l (11,3 mmol) de hidrazina monohidrato y la disolución se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 h y 30 min, la disolución se enfrió hasta 0 °C y se añadieron 3,2 ml de acetona. Después de 1 h, la disolución se concentró y se codestiló cinco veces con acetona. El glicopéptido bruto se liofilizó para producir 117 mg. El producto se purificó mediante RP-HPLC empleando un sistema de bomba Agilent 1200 con un detector de UV a 230 nm. La columna era Zorbax C18 (5 μ , 300 Å, 9,4 x 250 mm) (Agilent) y se realizó un gradiente con agua (TFA al 0,1%)/acetonitrilo a lo largo de 20 min, desde 72/28 a 62/38. La purificación produjo 5,8 mg (contenido neto en péptidos) de 6 con una pureza del 96,4%. El redimiento global fue de 2,7%.

- Con MeONa

25 Se disolvieron 24 mg (4,8 μ mol) de 4 en 3,2 ml de MeOH. El pH se ajustó a 14 (pH-metro, papel de pH húmedo aproximadamente 10,5) con MeONa al 1% en MeOH y la disolución se agitó a temperatura ambiente. La reacción se controló mediante RP-HPLC. Después de 2 h, la reacción se neutralizó con hielo seco y se evaporó hasta la sequedad. El péptido bruto se disolvió en TFA acuoso al 1% y se liofilizó. El producto se purificó mediante RP-HPLC empleando un sistema de bomba Agilent 1200 con un detector de UV a 230 nm. La columna era Kromasil C4 (5 μ , 100 Å, 10 x 250 mm) (AIT) y se realizó un gradiente con TFA acuoso al 0,1% (VWR)/acetonitrilo (Carlo Erba) a lo largo de 30 min, desde 73/27 a 62/38. La purificación produjo 754 μ g (contenido neto en péptidos) de 6 con una pureza del 91,4%. El redimiento global fue de 1,4%.

A partir de 5.

- Con H₂

35 Se disolvieron 10 mg (1,1 mmol) de 5 en 800 ml de NMP/H₂O 87,5/12,5. Después de la adición de 4 g de Pd al 10%/C de tipo 39 (Johnson Matthey), la reacción se agitó a 37 °C y 5 bares durante 170 h. Se añadieron de forma discontinua dos cantidades adicionales de catalizador después de 72 h (2 g) y 120 h (2 g). Al final de la reacción, el catalizador se filtró sobre Celite y se lavó con NMP/H₂O 87,5/12,5. El filtrado resultante se reunió con otros filtrados obtenidos de una reacción similar (1,35 mmol en total). Después de una dilución con H₂O (hasta NMP/H₂O 10/90), los filtrados se purificaron mediante RP-HPLC en dos etapas. La purificación principal se realizó en una columna Vydac C18 (300 Å, 10-15 μ m, 50 ml/mn) con TFA/H₂O/CH₃CN 0,1/94,9/5,0 en v/v/v (A) y con TFA/H₂O/CH₃CN 0,1/49,9/50,0 en v/v/v (B). El gradiente fue de B al 0% a lo largo de 15 min, B al 0-40% a lo largo de 5 min, B al 40-80% a lo largo de 60 min. La purificación secundaria se realizó en una columna Vydac C18 (300 Å, 10-15 μ m, 50 ml/mn) con AcOH/H₂O/CH₃CN 0,5/94,5/5,0 en v/v/v (A) y con AcOH/H₂O/CH₃CN 0,5/49,5/50,0 en v/v/v (B). El gradiente fue de B al 0% a lo largo de 15 min, B al 0-20% a lo largo de 5 min, B al 20-60% a lo largo de 60 min. Después de una concentración mediante RP-HPLC en una columna Daisogel SP-300-10-ODS-AP (20 ml/mn, isocrático TFA/H₂O/CH₃CN 0,1/49,9/50,0 en v/v/v), la disolución se evaporó en un evaporador rotatorio y se liofilizó

para producir 225 mg (contenido neto en péptidos) de **6** con una pureza del 95,3%. El rendimiento global fue de 1,5%.

ESMS: 10897,387 (C₄₈₁N₇₈₃N₁₀₇O₁₇₇ calc. 10897,123).

Conclusión

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla.

	Proceso inicial I ¹	Nuevo proceso II			
Grupo protector de carbohidratos (R)	Ninguno (H)	TBS	Ac	Bn	
Método de desprotección	-	TFA	NH ₂ -NH ₂	TfOH	H ₂
Rendimiento global ² (Pureza) ³	escala de 1-10 mg 3% (94,5%) > escala de 10 mg < 1% (<95%)	-	2,7% (96,4%)	1,6% (95,9%)	1,5% (95,3%)
Comentarios sobre la escala ⁴	Problemas de impurezas y reproducibilidad durante el aumento de escala => nueva vía de síntesis con protección de carbohidratos	Ningún compuesto esperado (desprotección parcial), impurezas++	Escala de aprox. 5 mg	Compromiso entre desprotección completa y degradación, escala de aprox. 5 mg	Escala de 225 mg

5 ¹ Ref. 5 y 9 (ref. 11 del documento WO 9843677, Carbohidrato-glicopéptido de antígeno múltiple, vacuna que lo comprende y sus usos).

² Calculado sobre el contenido neto en péptidos desde la sustitución de resina-Fmoc-βAla (incluye todas las etapas de síntesis desde **1**).

10 ³ Determinada mediante RP-HPLC: columna Zorbax 300SB C18 (3,5 μ, 3 x 150 mm) (Agilent), 0,8 ml/min, A: acetonitrilo + TFA al 0,1%, B: agua + TFA al 0,1%, gradiente A desde 13% al 53% a lo largo de 40 min, detección a 220 nm.

⁴ Se refiere al producto final (contenido neto en péptidos).

Comparado con la síntesis inicial empleando sintones de carbohidratos no protegidos (figuras 1 y 2), el nuevo proceso (que implica a carbohidratos protegidos, II, figuras 1 y 2) permite:

- 15
- minimizar los subproductos de la síntesis,
 - mejorar la repetibilidad del proceso,
 - aumentar la escala de la síntesis de una manera repetible.

20 Entre los protocolos ensayados en el nuevo proceso (tabla, figuras 1 y 2), tres emergen como las mejores estrategias: Ac/hidrazina, Bn/TfOH y Bn/H₂ (grupo protector/método de desprotección) (tabla). Todas conducen a un MAG-Tn3 con una pureza ≥ 95% de una manera repetible.

25 El método de Bn/TfOH produce el MAG-Tn3 con un rendimiento global del 1,6%. Este método se basa en un compromiso entre la completa desprotección y la degradación. Como alternativa, el método de Bn/H₂ produce el MAG-Tn3 con un rendimiento similar (1,5%) y, de forma más importante, el proceso se ha validado en la escala de 225 mg. Por último, el método de Ac/hidrazina produce el mayor rendimiento global (2,7%, comprado con 1,6% y 1,5%).

También se ha preparado un MAG-Tn3 basado en otro péptido (PV=KLFAVWKITYKDT) (SEQ ID NO:4) según el método de la invención (Ac/hidrazina, Bn/TfOH).

Ejemplo 2: Influencia de la proporción de sustitución de la resina y de la naturaleza de la fase estacionaria empleada para la purificación de MAG-Tn3

30 El MAG-Tn3 se preparó según el protocolo B a partir de una resina de poliestireno funcionalizada con Fmoc-β-Ala (comercializada con el nombre comercial de Fmoc-β-Ala-TentaGel R Trt) con dos proporciones de sustitución diferentes: 0,13 o 0,1 mmol/g (concretamente, el número de grupos Fmoc-β-Ala injertados con relación al peso de la

resina no injertada).

Después se realizó la purificación del MAG-Tn3 bruto mediante RP-HPLC sobre tres fases estacionarias diferentes (fases inversas) basadas en un gel de sílice injertado con grupos octadecilo, concretamente Vydac®, Jupiter® y Daisogel®. La purificación principal se realizó con TFA/H₂O/CH₃CN 0,1/94,9/5,0 en v/v/v (A) y con TFA/H₂O/CH₃CN 0,1/49,9/50,0 en v/v/v (B). El gradiente fue de B al 0% a lo largo de 15 min, B al 0-40% a lo largo de 5 min, B al 40-80% a lo largo de 60 min. La purificación secundaria se realizó con AcOH/H₂O/CH₃CN 0,5/94,5/5,0 en v/v/v (A) y con AcOH/H₂O/CH₃CN 0,5/49,5/50,0 en v/v/v (B). El gradiente fue de B al 0% a lo largo de 15 min, B al 0-20% a lo largo de 5 min, B al 20-60% a lo largo de 60 min.

Los resultados se indican en la siguiente tabla.

Lote de MAG-Tn3	Sustitución de la resina (mmol/g)	Fase estacionaria de la purificación	Cantidad (g) ^a	Pureza (%) ^b	Rendimiento global (%) ^c
1	0,13	Vydac®	0,275	95,3	2-4
2	0,13	Jupiter®	3,63	96,6	6
3	0,1	Daisogel®	4,65	99,2	11
4	0,1	Daisogel®	4,72	99,0	11

10 ^a Peso del polvo

^b Análisis mediante RP-HPLC: Zorbax 300SB C18 (3,5 μ, 3 x 150 mm, Agilent), A: acetonitrilo + TFA al 0,1%, B: H₂O + TFA al 0,1%, A al 15-35% (40 min).

^c El rendimiento incluye todas las etapas sintéticas desde la resina Fmoc-β-Ala y se calculó sobre el contenido neto en péptidos del producto final.

15 Vydac® C18, 300 Å, 10-15 μm (Grace), ref. 218MSB1015 o 218TPB1015 o 238TPB1015

Jupiter® C18, 300 Å, 10 μm (Phenomenex), ref. 04G-4055

Daisogel® C18, 300 Å, 10 μm (Daiso), ref. SP-300-10 -ODS-RPS

20 Estos resultados demuestran que los rendimientos del proceso de preparación de los conjugados según la invención y la pureza de los conjugados obtenidos pueden aumentar en gran medida reduciendo la proporción de sustitución de la resina y/o empleando una fase estacionaria apropiada.

Referencias

1. Kaiser, E., R.L. Colescott, C.D. Bossinger, and P.I. Cook, *Anal Biochem* (1970). 34: 595-8.
2. Maemura, M., A. Ohgaki, Y. Nakahara, H. Hojo, and Y. Nakahara, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* (2005). 69: 1575-1583.
- 5 3. Tam, J.P., W.F. Heath, and R.B. Merrifield, *J Am Chem Soc* (1986). 108: 5242-5251.
4. Tanaka, E., Y. Nakahara, Y. Kuroda, Y. Takano, N. Kojima, H. Hojo, and Y. Nakahara, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* (2006). 70: 2515-2522.
5. Bay, S., R. Lo-Man, E. Osinaga, H. Nakada, C. Leclerc, and D. Cantacuzène, *J. Peptide Res.* (1997). 49: 620-625;
- 10 6. : *Fmoc solid phase peptide synthesis, A practical approach*, Edited by W.C. Chan and P. D. White, Oxford University Press.
7. Sander, J. and H. Waldmann, *Chem Eur J* (2000). 6: 1564-1577.
8. Lo-Man, R., S. Vichier-Guerre, S. Bay, E. Dériaud, D. Cantacuzène, and C. Leclerc, *J. Immunol.* (2001). 166: 2849-2854.
- 15 9. Lo-Man, R., S. Vichier-Guerre, R. Perraut, E. Dériaud, V. Huteau, L. BenMohamed, O.M. Diop, P.O. Livingston, S. Bay, and C. Leclerc, *Cancer Res* (2004). 64: 4987-4994
10. Babino, A., D. Tello, A. Rojas, S. Bay, E. Osinaga, and P.M. Alzari, *FEBS Lett.* (2003). 536: 106-110.
11. WO9843677 - Multiple antigen glycopeptide carbohydrate, vaccine comprising the same and use thereof

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Institut Pasteur

5 <120> MÉTODO PARA PREPARAR CONJUGADOS DE CARBOHIDRATO-GLICOPÉPTIDO DE ANTÍGENO MÚLTIPLE

<130> F 226 CAS 188

<160> 4

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de toxina del tétanos

20 <400> 1

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

25 <210> 2
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Fragmento de toxina del tétanos

<400> 2

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
20

35 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de toxina del tétanos

45 <400> 3

Gly Gln Ile Gly Asn Asp Pro Asn Arg Asp Ile Leu
1 5 10

50 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Fragmento de proteína VP1 de poliovirus

<400> 4

Lys Leu Phe Ala Val Trp Lys Ile Thr Tyr Lys Asp Thr
1 5 10

REIVINDICACIONES

1.- Un método para preparar un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos de fórmula (I):



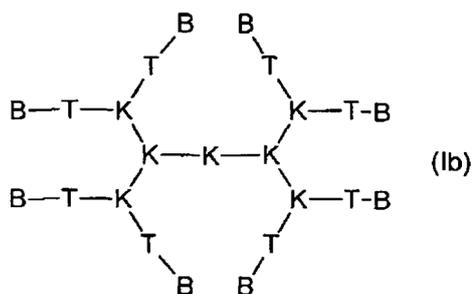
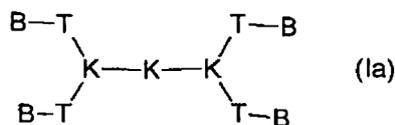
en la que:

- 5 - M es un núcleo de polilisina dendrimérico;
- T es un epitopo de células T;
- B es un epitopo de células B que contiene carbohidratos que comprende al menos un resto carbohidrato (b);
- n es un número entero y representa el número de grupos -T-B unidos covalentemente a M;

y dicho método comprende las etapas de:

- 10 i) acoplar un epitopo de células B que contiene carbohidratos protegido (B_{Pr}), cuyos grupos hidroxilo del resto carbohidrato (b) están protegidos con un grupo protector (Pr), con un compuesto $M(T)_n$, formando con ello un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos $M(T-B_{Pr})_n$, seleccionándose dicho grupo protector (Pr) del grupo que consiste en alilo, *p*-metoxibencilo (PMB), *t*-butildimetilsililo (TBDMS), benciloximetilo (BOM), levulinilo (Lev), benzoílo (Bz), 2,5-difluorobenzoílo, cloroacetilo, bencilo (Bn) o un acetilo (Ac), o formando, con los dos grupos hidroxilo a los cuales está unido, un isopropilidén cetal C_5-C_6 o un alquilcarbonato cíclico C_5-C_6 ; y
- 15 ii) retirar los grupos protectores Pr del conjugado $M(T-B_{Pr})_n$ obtenido, obteniendo con ello el conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos $M(T-B)_n$.

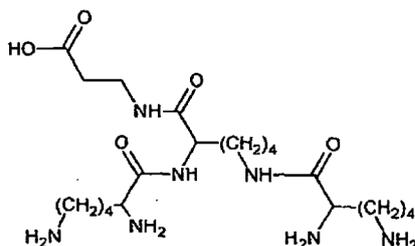
2.- El método de la reivindicación 1, en el que $M(T-B)_n$ se selecciona de las siguientes fórmulas (Ia) o (Ib):



en las que K es un resto lisina, y

- 20 T y B son como se define en la reivindicación 1.

3.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que M es $(K)_2K-\beta\text{Ala-OH}$ de fórmula:



- 4.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que T es un epitopo de células T que comprende un péptido.
- 5.- El método de la reivindicación 4, en el que T es o comprende un epitopo de células T CD8⁺ o CD4⁺.
- 6.- El método de la reivindicación 5, en el que T es o comprende un epitopo de células T CD4⁺.
- 5 7.- El método de la reivindicación 6, en el que T es o comprende un fragmento de proteína de poliovirus (PV), un fragmento de la toxina del tétanos, o un péptido PADRE.
- 8.- El método de la reivindicación 7, en el que T es es un péptido que consiste en QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:1).
- 9.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el resto carbohidrato (b) está unido a un resto aminoácido, péptido o lípido.
- 10.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que B es o comprende un resto carbohidrato seleccionado del grupo que consiste en:
- α -GalNAc-Ser,
 - α -GalNAc-Thr,

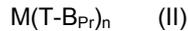
15 - β -GalNAc-Ser,

 - β -GalNAc-Thr,
 - β -Gal-(1-3)- α -GalNAc-Ser,
 - β -Gal-(1-3)- α -GalNAc-Thr,
 - (α -GalNAc-Ser/Thr)₂,

20 - (α -GalNAc-Ser/Thr)₃, y

 - (α -GalNAc-Ser/Thr)₆.
- 11.- El método de la reivindicación 10, en el que B es o comprende el resto (α -GalNAc-Ser/Thr)₃.
- 12.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo protector Pr es bencilo (Bn) o acetilo (Ac).
- 25 13.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa i) comprende las etapas de:
- a) acoplar un primer resto carbohidrato protegido (b_{Pr}), cuyos grupos hidroxilo están protegidos con un grupo protector (Pr) según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, con un compuesto M(T)_n, formando con ello un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos M(T-b_{Pr})_n; y
- b) repetir la etapa a) con más restos carbohidrato protegidos (b_{Pr}) hasta obtener un conjugado de carbohidrato protegido de fórmula (II) M(T-B_{Pr})_n.
- 30 14.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Pr es bencilo.
- 15.- El método de la reivindicación 14, en el que los grupos bencilo se retiran en presencia de TfOH o H₂.
- 16.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que Pr es acetilo.
- 17.- El método de la reivindicación 16, en el que los grupos acetilo se retiran en presencia de hidrazina o MeONa.

18.- Un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos de fórmula (II):



en la que:

- M es un núcleo de polilisina dendrimérico;

5 - T es un epitopo de células T;

- B_{Pr} es un epitopo de células B que contiene carbohidratos protegido, que comprende al menos un resto carbohidrato (b), cuyos grupos hidroxilo están protegidos con un grupo Pr según se define en la reivindicación 1; y

- n es un número entero y representa el número de grupos -T-B unidos covalentemente a M.

10 19.- El conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos de la reivindicación 18, en el que T es o comprende un péptido.

20.- El conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos de cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, en el que Pr es bencilo (Bn) o acetilo (Ac).

21.- El conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que B_{Pr} es un (α-GalNAc-Ser/Thr)₃ protegido.

15 22.- El conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en el que M es HO-βAla-K(K)₂.

23.- El conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en el que T es QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:1).

20 24.- El uso de un conjugado de epitopo de células T que contiene carbohidratos M(T-B_{Pr})_n de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, para preparar un conjugado de carbohidrato y péptido M(T-B)_n según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

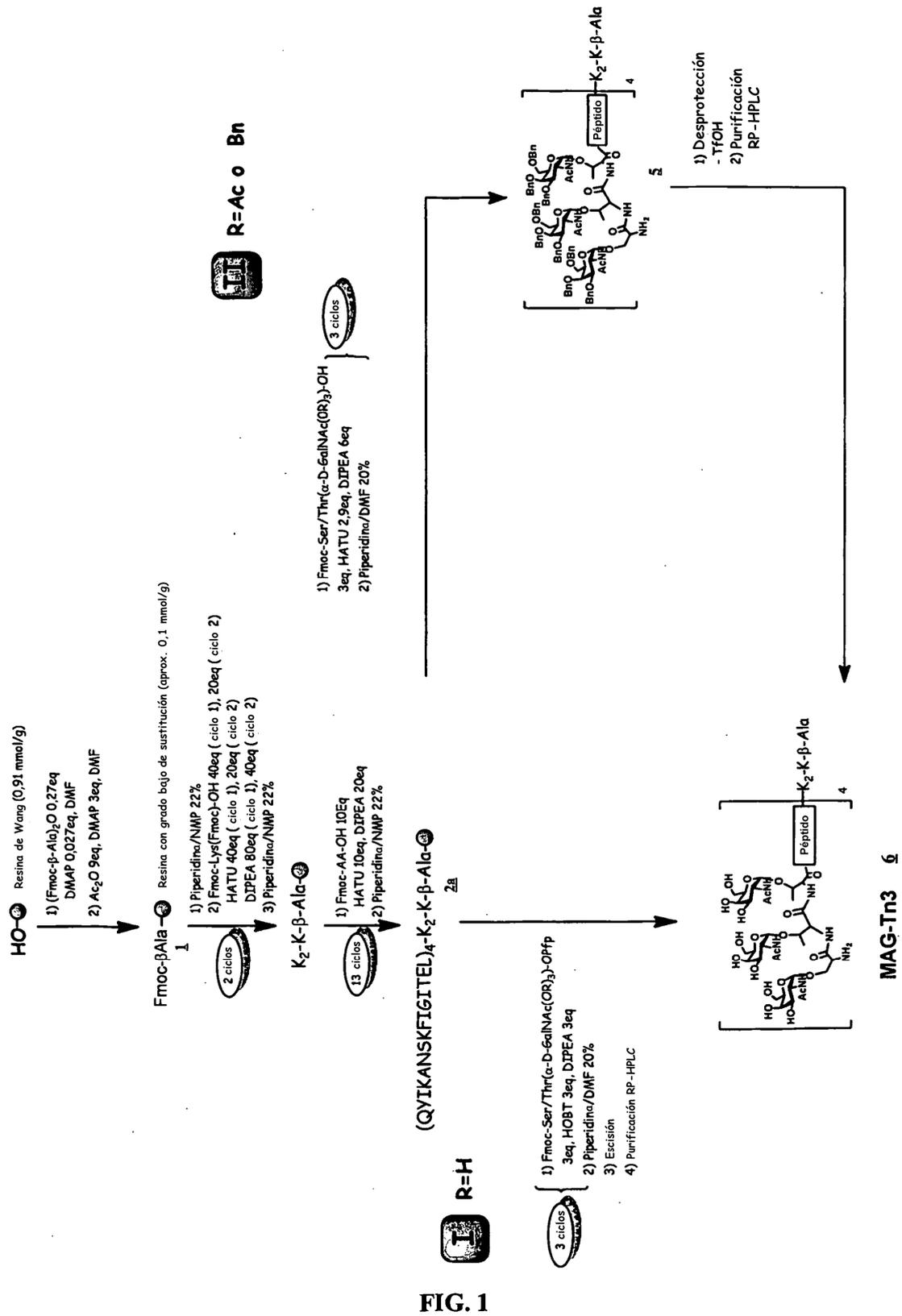


FIG. 1

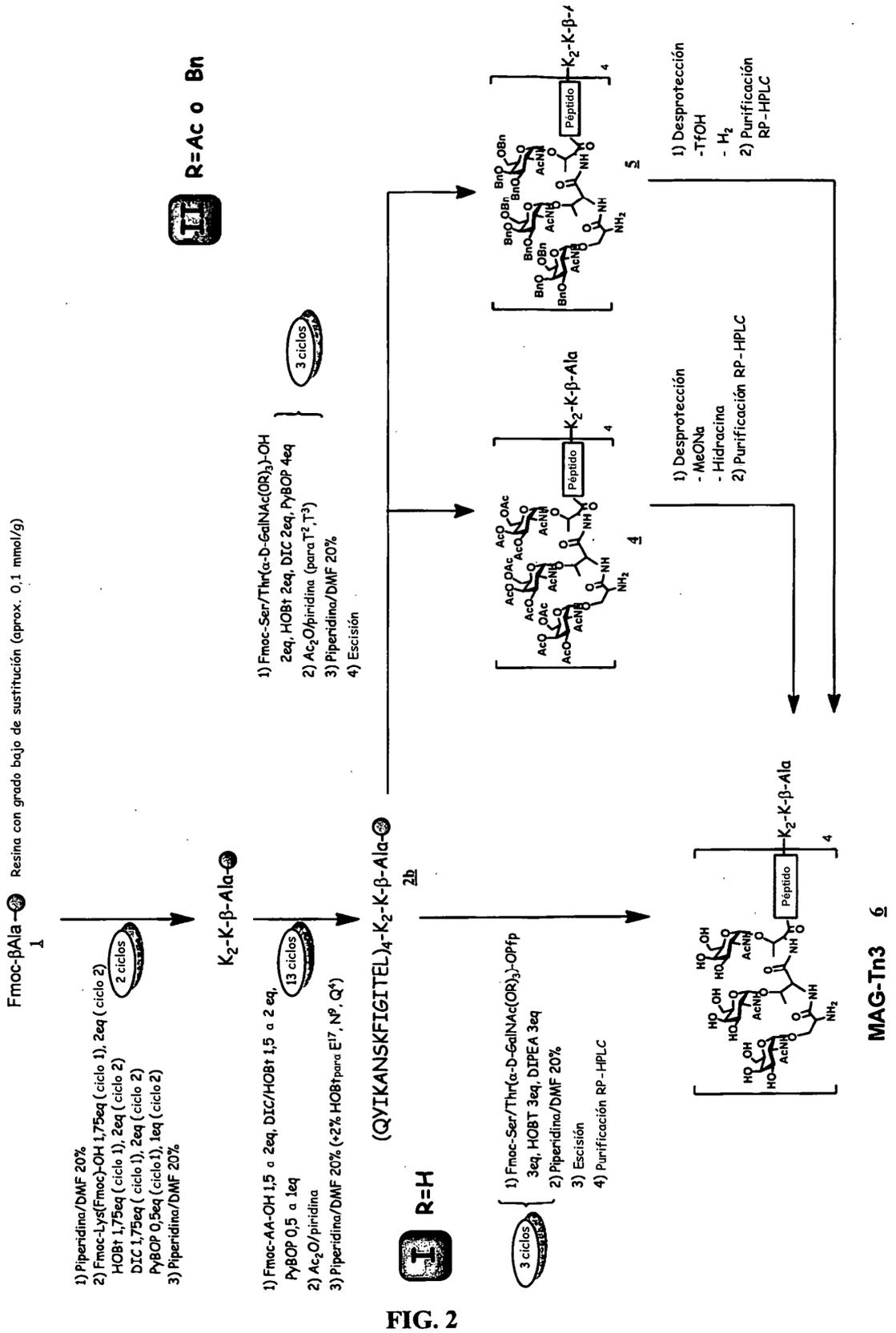


FIG. 2