

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 359**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/095** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2008 PCT/US2008/067315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2008 WO08157590**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2008 E 08771342 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2170391**

54 Título: **Polisacáridos modificados para vacunas conjugadas**

30 Prioridad:

**20.06.2007 US 945226 P**

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

**03.07.2017**

73 Titular/es:

**PFIZER IRELAND PHARMACEUTICALS (100.0%)  
Ringaskiddy  
Cork, IE**

72 Inventor/es:

**MICHON, FRANCIS y  
SARKAR, ARUN**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

ES 2 621 359 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

Polisacáridos modificados para vacunas conjugadas

## 1. CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere a métodos de elaboración de glicoconjugados inmunogénicos, en concreto para la utilización en composiciones farmacéuticas para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica en un sujeto. Los glicoconjugados inmunogénicos de la invención comprenden uno o más oligosacáridos o polisacáridos que están conjugados con una o más proteínas portadoras a través de un grupo aldehído activo. En consecuencia, la invención da a conocer métodos de elaboración de (i) oligosacáridos o polisacáridos microbianos no saturados derivados de N-acilo; (ii) conjugados novedosos de derivados de N-acilo no saturados; 10 y (iii) composiciones de glicoconjugados que comprenden moléculas conjugadas de fragmentos de derivados de N-acilo microbianos no saturados que sirven como enlace covalente a una o más proteínas. La invención también abarca las composiciones farmacéuticas de glicoconjugados inmunogénicos para la prevención o el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

## 2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] Las infecciones microbianas provocadas por bacterias grampositivas, tales como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix* y *Clostridium*, y por las bacterias gramnegativas, tales como *Haemophilus*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria* y determinados tipos de *Escherichia coli* provocan una morbilidad considerable alrededor del mundo. Los estreptococos, por ejemplo, constituyen un género amplio y variado de bacterias grampositivas que se han ordenado en diversos grupos en 20 función de la antigenicidad y estructura de su polisacárido de pared celular (Lancefield, R. C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J.Exp.Med. 57:571-595. Lancefield, R. C. 1938. A micro-precipitin technique for classifying hemolytic streptococci and improved methods for producing antigen. Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 38:473-478).

25 [0003] Los estreptococos del grupo B, por ejemplo, se clasifican en diversos tipos en función del polisacárido capsular, tales como los tipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, que representan la mayoría de la patogenicidad. Al igual que los descubrimientos con otros muchos patógenos bacterianos humanos, los polisacáridos capsulares de los estreptococos del grupo B pueden proporcionar protección eficaz contra infecciones con estas bacterias cuando se utilizan en vacunas (Véase Wessels, et al. 1990. Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B Streptococcus. J. Clin. Invest. 86:1428-1433. Wessels, et al. 30 1993. Stimulation of protective antibodies against type Ia and Ib group B streptococci by a type Ia polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. Infect. Immun. 61:4760-4766).

[0004] Las bacterias gramnegativas también constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad. Hasta el reciente desarrollo y utilización de vacunas polisacárido-proteína dirigidas contra bacterias *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib, pos sus siglas en inglés), las infecciones bacterianas causadas por Hib eran las 35 responsables de muchos casos de retraso mental en infantes.

[0005] Los infantes y los niños pequeños suelen tener respuestas inmunogénicas pobres a antígenos polisacáridos. Estas respuestas se caracterizan por ser independientes de células T y, por lo tanto, no están asociadas con atributos importantes como la memoria, la conmutación isotópica o la maduración de la afinidad, que son necesarios para conferir protección inmunológica duradera contra infecciones posteriores. Para sortear 40 la carencia de una respuesta inmunogénica eficaz en infantes y niños pequeños a polisacáridos, el sector ha trabajado en el desarrollo de enfoques para convertir la respuesta independiente de células T en una respuesta dependiente de células T mediante el acoplamiento de forma covalente de antígenos bacterianos polisacáridos con una proteína portadora para formar una molécula conjugada. Véase, Jennings et al. patente estadounidense con n.º 4,356,170).

45 [0006] Los adyuvantes son sustancias que incrementan la respuesta inmunitaria a antígenos y, por consiguiente, se han utilizado en muchas vacunas y vacunas candidatas. El efecto estimulante inmunitario de los adyuvantes no es específico a un antígeno, puesto que estimulan respuestas inmunitarias hacia muchos tipos distintos de antígenos. Los únicos adyuvantes que la FDA aprueba actualmente para uso humano son las sales de aluminio, pero muchos adyuvantes utilizados en la vacunación de animales y en nuevas vacunas candidatas son de procedencia microbiana (White, R. G., 1976. The adjuvant effect of microbial products on the immune response. 50 Ann.Rev.Microbiol. 30:579-595; incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad). Dichos adyuvantes incluyen el adyuvante de Freund, el *Corynebacterium parvum*, el muramil dipéptido, el toxoide tetánico, etc.

**[0007]** La conjugación de un polisacárido con una proteína portadora puede hacer de forma eficaz que ese polisacárido sea más inmunogénico. Las proteínas portadoras conocidas en la técnica incluyen toxina/toxoide tetánica/o, CRM<sub>197</sub>, proteínas de la membrana exterior de bacterias gramnegativas, por ejemplo, proteínas de alto peso molecular, P6 y P4 de *Haemophilus influenzae* no tipificable, CD y USPA de *Moraxella catarrhalis*, toxina/toxoide diftérica/o, toxina A de *Pseudomonas aeruginosa* destoxificada, toxina/toxoide del cólera, toxina/toxoide *pertussis*, exotoxinas/toxoide de *Clostridium perfringens*, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno central de la hepatitis B, proteína de rotavirus VP 7 o proteínas F y G del virus respiratorio sincitial.

**[0008]** El toxoide tetánico se ha utilizado durante décadas en esta capacidad como un portador, y se ha establecido su perfil de seguridad.

**[0009]** Las vacunas conjugadas de polisacáridos capsulares (PC) que tienen como objetivo una diversidad de infecciones bacterianas están actualmente en desarrollo y evaluación clínica. La inclusión de múltiples PC serotipos combinados en una inyección única se encuentra actualmente en estudio. La combinación de vacunas conjugadas de PC en una inyección única polivalente, sin embargo, puede dar lugar a una competición entre los diferentes componentes y, de forma desfavorable, afectar a la inmunogenicidad de cualquier conjugado individual (Fattom et al., 1999, Vaccine 17: 126-33).

**[0010]** En la técnica, se han descrito diversos procedimientos para conjugar polisacáridos capsulares con proteínas. La conjugación de un polisacárido con una proteína portadora puede hacer de forma eficaz que ese polisacárido sea más inmunogénico (Robbins, J. B. and R. Schneerson. 1990. Polysaccharide-protein conjugates: A new generation of vaccines. J. Infect. Dis. 161:821-832). Para otro análisis, véase Contributions to Microbiology and Immunology, vol 10, Conjugate Vaccines, volume editions J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr., 1989. En un método, se somete a los polisacáridos a hidrólisis con ácido suave para producir grupos terminales reductores capaces de reaccionar con proteína para formar un enlace covalente (Anderson, P. A., 1983, Infect. Immun., 39:233-238).

Sin embargo, los grupos glúcidos terminales que participan en la conjugación con proteína están en equilibrio entre un semiacetal y aldehído y, por consiguiente, se acoplan a la proteína con escasa eficacia. Para superar la escasa reactividad del azúcar reductor terminal, la técnica cambió a la oxidación suave para introducir grupos aldehídos estables en posiciones terminales de polisacáridos utilizados para conjugarse con proteína (véase Jennings et al. patente estadounidense con n.º 4,356,170, supra).

**[0011]** Otros métodos disponibles, por ejemplo, la activación mediante oxidación con IO<sub>4</sub><sup>-</sup> de algunos polisacáridos, pueden generar solamente un sitio activo por molécula de polisacárido y el acoplamiento consiguiente a proteína portadora genera vacunas glicoconjugadas de terminal único. Esta disposición se encuentra, por ejemplo, en vacunas glicoconjugadas para *Neisseria meningitidis* tipo C, tipo B y *Streptococcus* del grupo A. Sin embargo, un único sitio activo por molécula limita el grado de mejora de inmunogenicidad.

**[0012]** El documento WO9640239 expone polisacáridos de *N. meningitidis* modificados donde se conjuga una proteína con el terminal del polisacárido.

### 3. SUMARIO DE LA INVENCION

**[0013]** La invención a la que se refiere la presente memoria es como se establece en las reivindicaciones adjuntas a la presente descripción.

**[0014]** La presente invención da a conocer polisacáridos con múltiples sitios activos que permiten la generación de vacunas glicoconjugadas reticuladas inmunogénicas a través de la conjugación con una proteína portadora adecuada. Asimismo, el método también se puede aplicar a cualquier polisacárido que contenga un aminoazúcar, una clara ventaja sobre el método de oxidación con IO<sub>4</sub><sup>-</sup> existente, que requiere dos grupos adyacentes, esto es, vecinales, libres de (-OH) hidroxí en la cadena de azúcar.

**[0015]** La presente invención se refiere a métodos de elaboración de glicoconjugados inmunogénicos, en concreto para la utilización en composiciones farmacéuticas para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica en un sujeto. Los glicoconjugados inmunogénicos de la invención comprenden uno o más oligosacáridos o polisacáridos que están conjugados con una o más proteínas portadoras a través de un grupo aldehído activo. Al contrario que otros métodos de conjugación anteriores conocidos en la técnica, la presente invención da a conocer métodos que se pueden aplicar a cualquier polisacárido que contenga al menos un aminoazúcar; dichos métodos también producen conjugados solubles bien definidos que mantienen la antigenicidad.

**[0016]** La exposición da a conocer métodos de elaboración de un glicoconjugado inmunogénico que comprenden las siguientes etapas: desacetilar al menos un grupo N-acetilo en un oligosacárido o polisacárido que comprende

uno o más aminoazúcares, formar un oligosacárido o polisacárido que tiene al menos un aminoazúcar o preferiblemente múltiples aminoazúcares, comprendiendo un grupo amino primario; sustituir al menos uno de los grupos amino primarios con una fracción N-acilo que comprende una fracción alquilo no saturada que mide al menos 4 carbonos, generando de esta manera un oligosacárido o polisacárido que comprende al menos un sitio activo o preferiblemente múltiples sitios activos en el sitio de no saturación de la una o más fracciones alquilo; poner en contacto el compuesto con un agente oxidante, generar un grupo aldehído activo (-CHO) en el uno o más sitios no saturados en el oligosacárido o polisacárido; y conjugar el compuesto con una proteína portadora, con la consiguiente generación un glicoconjugado inmunogénico.

**[0017]** En modos de realización alternativos, la exposición da a conocer métodos de elaboración de un glicoconjugado inmunogénico que comprenden las siguientes etapas: sustituir al menos un grupo N-acetilo en un oligosacárido o polisacárido que comprende uno o más aminoazúcares por una fracción N-acilo que comprende una fracción alquilo no saturada que mide al menos 4 carbonos, con la consiguiente generación de un oligosacárido o polisacárido que comprende al menos un sitio activo o preferiblemente múltiples sitios activos en el sitio de no saturación de la una o más fracciones alquilo; poner en contacto el compuesto con un agente oxidante, generar un grupo aldehído activo (-CHO) en el uno o más sitios no saturados de las fracciones alquilo en el oligosacárido o polisacárido; y conjugar el compuesto con una proteína portadora, con la consiguiente generación de un glicoconjugado inmunogénico.

**[0018]** De acuerdo con los métodos de la exposición, la fracción N-acilo comprende una fracción alquilo no saturada. En determinados modos de realización, la fracción alquilo no saturada es una fracción C<sub>3</sub> C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, o C<sub>11</sub> y puede comprender uno o más dobles enlaces en la cadena principal de carbono. En determinados modos de realización, la fracción alquilo no saturada comprende solamente un doble enlace, esto es, un sitio de no saturación. En otros modos de realización, la fracción N-acilo es una fracción N-pentenoilo. La fracción N-acilo no saturada puede comprender cualquier fracción alquilo no saturada descrita en el presente documento o conocida en la técnica que sea adecuada para la oxidación de un aldehído activo en el sitio de no saturación y la conjugación consiguiente con una proteína portadora, por ejemplo, un anhídrido de acilo no saturado (p. ej., anhídrido pentenoico) o un haluro de acilo no saturado (p. ej., cloruro de pentenoilo, cloruro de acroloilo).

**[0019]** La oxidación de las moléculas de la exposición se limita preferiblemente a la oxidación de los dobles enlaces de la fracción N-acilo no saturada (esto es, el/los sitio(s) de no saturación de la fracción alquilo no saturada) y, por consiguiente, se lleva a cabo en condiciones moderadas como se define en el presente documento o como se conoce en la técnica, por ejemplo, oxidación con la utilización de peryodato en un intervalo de pH de 4-9.5, como se conoce en la técnica. Debido a las condiciones moderadas de oxidación, los sitios de no saturación situados muy cerca del grupo acilo no se oxidarán y/o no formarán un grupo aldehído activo para permitir la conjugación consiguiente con una proteína portadora. En consecuencia, para utilizarse en los métodos de la invención, el sitio de no saturación (esto es, la ubicación del doble enlace) del grupo alquilo no saturado no se encuentra ni entre los carbonos 1 y 2 ni entre los carbonos 2 y 3 del grupo alquilo no saturado (véase, p. ej., la figura 1 para la numeración del grupo alquilo, como se acepta en la técnica y se utiliza en el presente documento). En determinados modos de realización, la fracción alquilo no saturada comprende solamente un doble enlace. En otros modos de realización, la fracción alquilo no saturada comprende un doble enlace entre los dos carbonos terminales de la cadena principal de carbono.

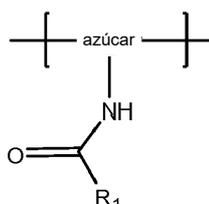
**[0020]** La exposición también da a conocer un glicoconjugado inmunogénico que comprende: a) al menos un oligosacárido o polisacárido que comprende uno o más aminoazúcares preparados mediante

i) desacetilación del grupo N-acetilo de dicho uno o más aminoazúcares; ii) sustitución del grupo amino primario resultante del aminoazúcar con un grupo N-acilo que comprende un grupo alquilo no saturado de al menos 4 carbonos; y iii) oxidación de dicho grupo alquilo no saturado para generar un grupo alquilo de al menos 3 carbonos con un grupo aldehído activo en el terminal de la cadena principal; y b) una proteína portadora conjugada con ello. De acuerdo con los métodos de la invención, el sitio de no saturación, esto es, el doble enlace del grupo alquilo no saturado no se encuentra ni entre los carbonos 1 y 2 ni entre los carbonos 2 y 3 de la cadena principal (véase, p. ej., la figura 1 para la numeración de carbono). En los modos de realización preferidos, la cadena de alquilo no saturada es una cadena de al menos 5 carbonos de longitud. En otros modos de realización, el sitio de no saturación o la cadena de alquilo previa a la oxidación está entre los dos carbonos terminales de la cadena de alquilo no saturada. Según los métodos de la invención, la proteína portadora se conjuga con el al menos un polisacárido u oligosacárido a través del grupo aldehído activo por medio de cualquier método conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento.

**[0021]** La exposición también proporciona un glicoconjugado inmunogénico que comprende: a) al menos un oligosacárido o polisacárido que comprende uno o más aminoazúcares que comprenden uno o más grupos N-acetilo, donde dicho uno o más grupos N-acetilo han sido sustituidos por un grupo N-acilo que comprende un

- grupo alquilo de al menos 3 carbonos que comprende un grupo aldehído activo en el terminal de dicha cadena principal de grupo alquilo y b) una proteína portadora conjugada con ello. En los modos de realización preferidos, la cadena de alquilo que comprende el grupo aldehído activo tiene al menos 4 carbonos de longitud. Según los métodos de la invención, la proteína portadora se conjuga con el al menos un polisacárido u oligosacárido a través del grupo aldehído activo por medio de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, aminación reductiva, y/o descrito en el presente documento.

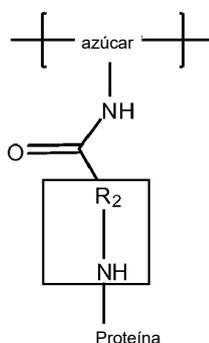
**[0022]** De acuerdo con la exposición, el al menos un grupo N-acetilo en el uno o más aminoazúcares del polisacárido u oligosacárido se sustituye para formar el compuesto como sigue (Fórmula I):



- 10 donde R<sub>1</sub> es una fracción alquilo no saturada C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub> o C<sub>11</sub> y [azúcar] representa el dicho uno o más aminoazúcares del polisacárido u oligosacárido. En determinados modos de realización, dicho uno o más aminoazúcares es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido. En otros modos de realización, dicho uno o más aminoazúcares no es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido. En modos de realización específicos, R<sub>1</sub> es C<sub>3</sub> o C<sub>4</sub>, por ejemplo, de manera que se forme un grupo N-butenilo o grupo N-pentenoilo, respectivamente. En otros modos de realización, R<sub>1</sub> contiene solamente un doble enlace, esto es, sitio de no saturación; dicho doble enlace está situado entre los dos carbonos terminales de la cadena principal de alquilo.

- [0023]** La fracción N-acilo no saturada sirve como fracción de enlace para la conjugación del oligosacárido o polisacárido con la proteína portadora a través de la oxidación del sitio de no saturación con un grupo aldehído activo y la conjugación consiguiente de dicha proteína. La oxidación del sitio de no saturación de la fracción alquilo puede llevarse a cabo mediante cualquier método descrito en el presente documento y/o conocido en la técnica, por ejemplo, con peryodato. Puesto que la oxidación puede escindir la cadena de polisacárido, la etapa de oxidación abarcada por la presente invención se lleva a cabo solamente en condiciones moderadas, por ejemplo, baja temperatura (por ejemplo, aproximadamente 4 °C a aproximadamente 27 °C) a un intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.5. Debido a las condiciones moderadas de oxidación, para que el sitio de no saturación se oxide de manera eficaz, el doble enlace de la fracción alquilo no saturada no puede estar entre los carbonos 1 y 2 o entre los carbonos 2 y 3 de la cadena principal de alquilo no saturada (véase, p. ej., la figura 1 para la numeración de carbono). En un ejemplo no limitativo según este modo de realización, donde R<sub>1</sub> es una fracción no saturada C<sub>3</sub> (que forma un grupo N-butenilo en la Fórmula 1), el grupo N-acilo comprende un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 de la cadena principal de alquilo. En otros modos de realización, donde R<sub>1</sub> comprende una cadena mayor de 3 carbonos, el sitio de no saturación puede estar en posiciones mayores que el carbono 4.

- [0024]** Según los productos y métodos de la exposición posteriores a la oxidación y la conjugación, la proteína y el oligosacárido o polisacárido del glicoconjugado están enlazados de forma covalente a través de un enlace como se muestra a continuación (en el cuadrado; Fórmula II):



donde R<sub>2</sub> es una fracción alquilo saturada C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub> o C<sub>10</sub>, y donde NH (en el cuadrado) pertenece a uno de los grupos NH<sub>2</sub> primario de la proteína, por ejemplo, residuos de lisinila o residuos de

arginila. El [azúcar] de la Fórmula II representa el dicho uno o más aminoazúcares del polisacárido u oligosacárido. En determinados modos de realización, dicho uno o más aminoazúcares es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido. En otros modos de realización, el dicho uno o más aminoazúcares no es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido. R<sub>2</sub> de la Fórmula II se deriva de R<sub>1</sub> de la Fórmula I. R<sub>1</sub> de la Fórmula I (esto es, una fracción alquilo no saturada) se selecciona de manera que se obtenga, después de la oxidación y la conjugación, como se conoce en la técnica y/o se describe en el presente documento, la fracción enlace deseada R<sub>2</sub> o Fórmula II (esto es, una fracción alquilo saturada).

**[0025]** Según los métodos de la invención, el N-acetilo del uno o más aminoazúcares del polisacárido u oligosacárido puede estar enlazado con el aminoazúcar en cualquier posición, incluidas 1, 2, 3, 4 o 5 del azúcar. Las estructuras de los aminoazúcares se conocen en la técnica y, por lo tanto, la posición de dicho enlace puede determinarse de forma rutinaria. Por ejemplo, donde el aminoazúcar es GlcNac, el grupo N-acetilo del azúcar está en el carbono 2; donde el aminoazúcar es ácido siálico, el grupo N-acetilo del azúcar está en el carbono 4.

**[0026]** En un modo de realización específico, el grupo N-acetilo de la molécula de azúcar se sustituye por un grupo N-pentenoilo, donde el grupo N-pentenoilo sirve como fracción de enlace para la conjugación del polisacárido u oligosacárido con la proteína portadora, por ejemplo, conjugación mediante aminación reductiva. En un modo de realización específico, posterior a la oxidación y la conjugación, el grupo de enlace es un grupo N-acilo saturado con una cadena principal C<sub>4</sub> saturada. Según los métodos de la invención, el grupo N-acetilo que ha de ser sustituido puede ser el de cualquier aminoazúcar, incluyendo, pero sin carácter limitativo, GlcNac, ManNAc, GalNAc y ácido siálico.

**[0027]** En determinados modos de realización de la invención, la sustitución de los grupos N-acetilo se lleva a cabo con un álcali.

**[0028]** La invención abarca la utilización de cualquier proteína portadora conocida en la técnica y/o descrita en el presente documento que sea adecuada para su utilización en vacunas conjugadas inmunogénicas y que funcione para convertir una respuesta inmunitaria independiente de células T en una respuesta inmunitaria dependiente de células T. En determinados modos de realización, la proteína portadora es una proteína bacteriana o un fragmento de la misma, por ejemplo, una toxina bacteriana o toxoide bacteriano o un fragmento de los mismos. Ejemplos no limitativos de proteínas portadoras que pueden utilizarse según los métodos de la invención incluyen toxina/toxoide tetánica/o, CRM<sub>197</sub>, proteínas de la membrana exterior de bacterias gramnegativas, P6 y P4 de *Haemophilus influenzae* no tipificable, proteína derivada de *Haemophilus influenzae* tipo B, CD y USPA de *Moraxella catarrhalis*, toxina/toxoide diftérica/o, toxina A de *Pseudomonas aeruginosa* destoxicada, toxina/toxoide del cólera, toxina/toxoide *pertussis*, exotoxinas/toxoide de *Clostridium perfringens*, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno central de la hepatitis B, proteína de rotavirus VP7 y proteínas F y G del virus respiratorio sincitial.

**[0029]** En determinados modos de realización, el oligosacárido o polisacárido utilizado de acuerdo con los métodos de la invención es un polisacárido de una bacteria o de un fragmento antigénico de la misma. Dichas bacterias incluyen, pero sin carácter limitativo, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Clostridium*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria* y *Escherichia*. En modos de realización relacionados, el oligosacárido o polisacárido es un polisacárido capsular derivado de cualesquiera bacterias capsulares, por ejemplo, estreptococos del grupo B Ia, Ib, II, III, V, VI o VIII; *Streptococcus* del grupo A; *Neisseria meningitidis* tipos B, C, Y o W135; *S. pneumoniae* tipos III, IV o XIV; o *Escherichia coli* K1. En los modos de realización preferidos, el oligosacárido o polisacárido se elige de modo que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra las bacterias de las que se deriva. En determinados modos de realización, el oligosacárido o polisacárido no es un oligosacárido o polisacárido de origen natural, por ejemplo, pueden sintetizarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, o pueden derivarse de compuestos de origen natural pero modificarse de manera que el oligosacárido o polisacárido resultante no se halle en la naturaleza. Por ejemplo, el polisacárido u oligosacárido puede modificarse con el fin de incrementar la antigenicidad, por ejemplo, inducir una respuesta inmunitaria incrementada contra el polisacárido u oligosacárido de tipo salvaje relativo. Según los métodos de la invención, los polisacáridos útiles comprenden al menos un epítipo antigénico capaz de inducir una respuesta inmuno-específica. Dichos polisacáridos u oligosacáridos contienen preferiblemente al menos 7 fracciones sacáridas, pero pueden manifestar actividad con tan sólo dos fracciones sacáridas. Los polisacáridos u oligosacáridos pueden estar no ramificados o ramificados y pueden tener un peso molecular de desde aproximadamente 1000 a varios millones de daltones. En determinados modos de realización, los polisacáridos u oligosacáridos poseen una o más modificaciones químicas. Ejemplos no limitativos de modificaciones químicas abarcadas por la presente invención incluyen carboxilación, sulfonación, derivados sulfatados y fosfatados de polisacáridos, sus sales y mezclas de los mismos.

**[0030]** La presente exposición también abarca la utilización de composiciones, en concreto composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más inmunoglicoconjugados en concentraciones terapéuticamente

eficaces para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. La inducción de una respuesta inmunitaria al oligosacárido o polisacárido del inmunoglicoconjugado es útil para el tratamiento y/o prevención de una infección por el/los organismo(s) patógeno(s) de los que se deriva el oligosacárido o polisacárido. En consecuencia, en determinados modos de realización, el glicoconjugado de la invención puede utilizarse como una vacuna para la profilaxis o como un terapéutico. En determinados modos de realización, un inmunoglicoconjugado comprende una pluralidad de polisacáridos y/u oligosacáridos derivados de más de un tipo o cepa de bacterias, de manera que induce una respuesta inmunitaria contra más de una especie/tipo o cepa de bacterias. En otros modos de realización, el oligosacárido o polisacárido utilizado en la elaboración del inmunoglicoconjugado de la invención se sintetiza para comprender múltiples dominios antigénicos de múltiples especies/cepas de bacterias y/u otros organismos patógenos, por ejemplo, protozoarios, de manera que se genere una respuesta inmunitaria polivalente en la administración a un sujeto.

**[0031]** La invención también se refiere a preparaciones inmunogénicas para humanos o animales, en concreto a composiciones inmunogénicas que comprenden uno o más inmunoglicoconjugados de la invención. En determinados modos de realización, las preparaciones inmunogénicas comprenden una pluralidad de inmunoglicoconjugados y/o una pluralidad de proteínas portadoras. Puesto que los inmunoglicoconjugados pueden crearse para comprender polisacáridos u oligosacáridos de múltiples tipos o cepas de bacterias y/o crearse para comprender un polisacárido u oligosacárido quimérico (esto es, un polisacárido u oligosacárido que comprende epítomos de múltiples tipos y/o cepas de bacterias), las formulaciones inmunogénicas de la invención pueden crearse para la profilaxis o la terapia contra múltiples tipos de bacterias, variante de cepa o variantes de cepas. Pueden utilizarse muchos métodos conocidos y la rutina en la técnica para inmunizar a un sujeto con las formulaciones inmunogénicas de la invención incluyendo, pero sin carácter limitativo, vía intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea.

### 3.1 TERMINOLOGÍA

**[0032]** Como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se utiliza junto con un número se refiere a cualquier número dentro de 1, 5 o 10 % del número referenciado o dentro del error experimental típico de los métodos estándar utilizados para la medición y/o determinación de dicho número.

**[0033]** Los términos "portador/a", "proteína portadora" o "polipéptido portador" se utilizan de forma intercambiable para referirse a una fracción polipéptida a la que están enlazados los antígenos polisacáridos de forma covalente. Una proteína portadora es normalmente inmunogénica y, por lo tanto, puede contribuir también a la valencia de la vacuna. El enlace a la proteína portadora normalmente incrementa la antigenicidad de las moléculas de carbohidratos conjugadas. La proteína portadora puede provenir del mismo organismo diana que los polisacáridos enlazados a él o provenir de un organismo distinto. Por ejemplo, la proteína portadora puede ser una proteína bacteriana, incluyendo, pero sin carácter limitativo, una toxina bacteriana o toxoide bacteriano. En modos de realización preferidos, la proteína portadora se selecciona de manera que funcione para convertir una respuesta inmunitaria independiente de células T en una respuesta inmunitaria dependiente de células T.

**[0034]** Como se utiliza en el presente documento, el término "en combinación" en el contexto de la administración de una/s terapia/s a un sujeto, se refiere a la utilización de más de una terapia (p. ej., más de un agente profiláctico y/o agente terapéutico). La utilización del término "en combinación" no restringe el orden en el que las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos) se administran a un sujeto. Una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas antes), simultáneamente con o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas) la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) a un sujeto. En modos de realización específicos, los glicoconjugados inmunogénicos de la invención pueden utilizarse en combinación con una o más terapias adicionales, por ejemplo, vacunas, conocidas en la técnica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad infecciosa, por ejemplo, una enfermedad provocada por una infección con una o más especies/cepas de bacterias.

**[0035]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "controlar", "que controla" y "control" se refieren a los efectos beneficiosos que deriva un sujeto de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que no da lugar a una cura de la enfermedad. En determinados modos de realización, se administran una o más terapias a un sujeto (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos, tales como una composición de la invención) para "controlar" una enfermedad infecciosa o una afección o síntoma asociados a la misma, para prevenir el avance o el empeoramiento de la enfermedad/trastorno.

**[0036]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención del inicio de, la reaparición o una reducción de uno o más síntomas de una enfermedad/trastorno (por ejemplo, infección por una bacteria) en un sujeto como resultado de la administración

de una terapia (por ejemplo, una composición profiláctica o terapéutica). Como se utiliza en el presente documento, "prevención" también abarca la prevención de infecciones por uno o más tipos y/o cepas de bacterias que se asocian con la utilización de los inmunoconjugados de la invención como una vacuna.

5 **[0037]** El término "polisacárido" y "oligosacárido", como se utilizan en el presente documento, se utilizan en su sentido más amplio para referirse a los sacáridos que comprenden una pluralidad de unidades repetitivas, incluyendo, pero sin carácter limitativo, los sacáridos que tienen desde 2 hasta más de 2000 unidades repetitivas. Normalmente, como se acepta en la técnica y como se utiliza en el presente documento, el término "polisacárido" se refiere a un sacárido que tiene desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 2000 o más unidades repetitivas. Como se acepta en la técnica y como se utiliza en el presente documento, el término "oligosacárido" se refiere a un sacárido que tiene desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 40, 45 o 50 unidades repetitivas. La unidad repetitiva de un polisacárido puede ser una única molécula de monosacárido o puede ser una molécula de disacárido. En determinados modos de realización, la unidad repetitiva es 3 o más moléculas de monosacárido. Según los métodos de la invención, pueden unirse químicamente o sinterizarse sintéticamente fragmentos de polisacáridos u oligosacáridos de diferentes tipos y/o cepas de bacterias para formar una única cadena de polisacárido u oligosacárido que comprende múltiples epítomos de los múltiples tipos y/o cepas de bacterias de los que derivan y/o se identifican originalmente los fragmentos; en consecuencia, la composición de la unidad o las unidades repetitivas del polisacárido u oligosacárido de la invención necesita ser constante a lo largo de la cadena de sacárido entera. Los polisacáridos u oligosacáridos abarcados por los métodos de la invención comprenden uno o más aminoazúcares. En determinados modos de realización, dicho uno o más aminoazúcares es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido. En otros modos de realización, el dicho uno o más aminoazúcares no es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido.

25 **[0038]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "sujeto" o "paciente" se utilizan de forma intercambiable. Como se utilizan en el presente documento, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal (por ejemplo, mamíferos). En algunos modos de realización, el sujeto es un mamífero, incluidos no primates (por ejemplo, camellos, burros, cebras, vacas, caballos, gatos, perros, ratas y ratones) y primates (por ejemplo, monos, chimpancés y humanos). En algunos modos de realización, el sujeto es un mamífero no humano. En otros modos de realización, el sujeto es un humano. En determinados modos de realización, el sujeto es un infante humano, niño pequeño, adolescente, mujer o mujer embarazada.

30 **[0039]** El término, "respuesta inmunitaria terapéutica", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un incremento en la inmunidad humoral y/o celular, como se mide con técnicas estándar, que se dirige hacia el glicoconjugado. Preferiblemente, pero sin carácter limitativo, el nivel inducido de inmunidad humoral dirigido hacia el glicoconjugado es al menos cuatro veces, ocho veces o diez veces, preferiblemente al menos dieciséis veces mayor que los niveles de la inmunidad humoral dirigida hacia el glicoconjugado antes de la administración de las composiciones de la presente invención al sujeto. La respuesta inmunitaria también puede medirse cualitativamente, por medio de un ensayo *in vitro* o *in vivo* adecuado, donde un paro en el avance o una remisión de una enfermedad infecciosa o los síntomas de la misma en el sujeto se considera que indica la inducción de una respuesta inmunitaria terapéutica.

40 **[0040]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "terapias" y "terapia" pueden referirse a cualquier protocolo o protocolos, método o métodos y/o agente o agentes que pueden utilizarse en la prevención, tratamiento, control o mejora de una enfermedad/trastorno (por ejemplo, infección bacteriana o una afección o síntoma asociado con la misma). En determinados modos de realización, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a terapia biológica, terapia de apoyo, y/u otras terapias útiles en el tratamiento, control, prevención o mejora de una enfermedad o afección o síntoma(s) asociados con la misma, una infección o una afección o síntoma asociado con la misma, que conozca un experto en la materia.

50 **[0041]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" se refieren a cualquier agente o agentes que pueden utilizarse en la prevención, tratamiento, control o mejora de una enfermedad (por ejemplo, infección bacteriana o una afección o síntoma asociado con la misma). Preferiblemente, un agente terapéutico es un agente que se conoce por ser útil para, o ha sido utilizado o se utiliza actualmente para la prevención, tratamiento, control o mejora de una enfermedad o síntoma asociado con la misma (por ejemplo, una infección bacteriana o una afección o síntoma asociado con la misma).

**[0042]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto para una enfermedad se refiere a la erradicación, reducción o mejora de los síntomas de dicha enfermedad/trastorno (por ejemplo, trastorno bacteriano).

#### 55 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0043]**

La **figura 1** muestra un flujograma esquemático de un método general de sintetización de un glicoconjugado N-acilado, donde n=número de unidades repetitivas, que varía en función del tipo de oligo/polisacárido y puede ser 1 hasta 1000 o más.

5 La **figura 2** muestra un flujograma esquemático de un método general de conjugación polisacárido-proteína, por ejemplo, la preparación del conjugado polisacárido-proteína de *Streptococcus* del grupo A a través de N-Pentenoilación. n=número de unidades repetitivas, que depende de la naturaleza del polisacárido u oligosacárido y puede ser 1 hasta 1000 o más.

10 La **figura 3** representa el espectro de 600 MHz de <sup>1</sup>H-RMN del polisacárido de *Streptococcus* del grupo A nativo y modificado.

La **figura 4** muestra un flujograma esquemático de un método general de conjugación polisacárido-proteína, por ejemplo, la preparación de conjugados polisacárido-proteína de meningococo B a través de N-pentenoilación, donde n=número de unidades repetitivas.

La **figura 5** representa el espectro de 600 MHz de <sup>1</sup>H-RMN del polisacárido meningocócico B modificado.

15 La **figura 6** muestra la respuesta inmunitaria contra polisacáridos generados por vacunación con conjugados toxoide tetánico-polisacárido de *Streptococcus* del grupo A (GASP-TT, por sus siglas en inglés) en ratones Balb/c. Leyendas: *Preimmune*: Concentración de suero IgG contra el polisacárido de *Streptococcus* del grupo A antes de la inmunización con conjugados. *GASP-TT*: Concentración de suero IgG contra el polisacárido de *Streptococcus* del grupo A tras la inmunización con conjugado polisacárido-proteína de *Streptococcus* del grupo A, preparado mediante el método tradicional (reducción del polisacárido nativo y generación de solamente un sitio activo por molécula de polisacárido mediante oxidación moderada con Na-metaperyodato). *N-But-GASP-TT(1)*: Concentración de suero IgG contra el polisacárido de *Streptococcus* del grupo A tras la inmunización con conjugados polisacárido-proteína de *Streptococcus* del grupo A, preparados mediante el método nuevo (generación de múltiples sitios activos por molécula de polisacárido mediante N-pentenoilación y oxidación del polisacárido nativo). Aproximadamente 5-10 % de los residuos de GlcNAc se pentenoilaron. *N-But-GASP-TT(2)*: Concentración de suero IgG contra el polisacárido de *Streptococcus* del grupo A tras la inmunización con conjugados polisacárido-proteína de *Streptococcus* del grupo A, preparados mediante el método nuevo (generación de múltiples sitios activos por molécula de polisacárido mediante N-pentenoilación y oxidación del polisacárido nativo). Aproximadamente 15-20 % de los residuos de GlcNAc se pentenoilaron.

20

25

30

**5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

**[0044]** La presente invención da a conocer, en general, métodos de elaboración de (i) oligosacáridos o polisacáridos microbianos no saturados derivados de N-acilo; (ii) conjugados inmunogénicos novedosos derivados de los oligosacáridos o polisacáridos no saturados derivados de N-acilo enlazados de forma covalente a una proteína portadora; y (iii) composiciones de glicoconjugados inmunogénicas que comprenden moléculas de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. La exposición también abarca métodos de utilización de estas composiciones como vacunas. Como se expone en el presente documento, la invención proporciona métodos que pueden facilitar la generación de múltiples sitios activos por oligosacárido o polisacárido, en concreto para la conjugación con una o más proteínas, por ejemplo, proteínas portadoras. La invención también proporciona métodos de formación de oligosacáridos o polisacáridos con múltiples sitios activados que, cuando se conjugan con una o más proteínas portadoras adecuadas, generan vacunas glicoconjugadas reticuladas con eficacia mejorada en comparación con los métodos de elaboración anteriormente conocidos en la técnica. En determinados modos de realización, los métodos de la presente invención también generan vacunas glicoconjugadas que muestran inmunogenicidad mejorada en comparación con vacunas similares conocidas en la técnica. El método que se presenta en el presente documento también puede aplicarse a cualquier polisacárido que contenga al menos un aminoazúcar, una clara ventaja sobre los métodos de oxidación con peryodato existentes, que requieren dos grupos adyacentes libres de hidroxilo en la cadena de azúcar.

35

40

45

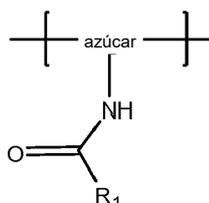
**[0045]** Los oligosacáridos o polisacáridos que contienen al menos un aminoazúcar que tiene un grupo N-acetilo (por ejemplo, pero sin carácter limitativo, los que comprenden uno o más de GlcNAc, ManNAc, GalNAc y/o ácido siálico) se tratan para desacetilar el uno o más grupos N-acetilo para generar en el oligosacárido o polisacárido al menos un aminoazúcar y preferiblemente múltiples aminoazúcares que contengan un grupo amino primario. El al menos uno o varios grupos amino primarios, a continuación, se sustituye por una fracción N-acilo para generar al menos un sitio activo y preferiblemente múltiples sitios activos por molécula de polisacárido u oligosacárido. Para

50

5 permitir la oxidación consiguiente, la N-acilación se lleva a cabo utilizando al menos una cadena alifática no saturada de 5 carbonos (por ejemplo, pentenoilación). La utilización de cadenas alifáticas no saturadas de más de 5 carbonos de longitud también se abarcan en la invención (p. ej., una cadena alifática no saturada de 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12, 13- o 14- o más carbonos), siempre que el sitio de no saturación no esté entre los carbonos 1 y 2 o entre los carbonos 2 y 3 de dicha fracción (Véase la figura 1 o, según la Fórmula I, entre el carbono del grupo aldehído y C<sub>1</sub> de R<sub>1</sub> o entre C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> de R<sub>1</sub>). Puesto que la oxidación puede escindir la cadena de polisacárido u oligosacárido, los métodos de oxidación abarcados por la invención se seleccionan (como se describe en el presente documento y/o como se conoce en la técnica) para oxidar solamente el sitio o los sitios de no saturación de la cadena alifática no saturada. Dichas condiciones de oxidación se denominan normalmente "moderadas" en la técnica y pueden determinarse mediante experimentación rutinaria. Por lo tanto, los métodos de la invención abarcan la utilización de un agente oxidante que oxida grupos no saturados (por ejemplo, la utilización de O<sub>3</sub> [para ozonólisis] o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en condiciones moderadas (por ejemplo, en un intervalo de temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 27 °C y un intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.5 en una solución considerablemente tamponada) para generar un grupo aldehído activo (-CHO) en el sitio o los sitios de no saturación de dicha fracción alquilo. En determinados modos de realización, el sitio de no saturación de la fracción alquilo está entre los dos carbonos terminales de la cadena principal de alquilo. La oxidación del doble enlace escinde la cadena de alquilo principal en el sitio de no saturación y genera un grupo aldehído activo en el nuevo terminal de la cadena de alquilo. Por ejemplo, en modos de realización donde la cadena alifática no saturada es una C<sub>5</sub> con un doble enlace único entre los carbonos C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub>, la oxidación dará lugar a la cadena de 4 carbonos con el aldehído en C<sub>4</sub>. En modos de realización donde la cadena alifática no saturada tiene más de un doble enlace, esto es, sitios de no saturación, la reacción de oxidación puede afectar a uno o ambos sitios de no saturación; sin embargo, puesto que la reacción escinde la cadena principal de carbono, el grupo aldehído siempre estará en el terminal de cadena alifática recién formado. En consecuencia, donde la cadena principal que comprende el grupo no saturado tenga más de un sitio de no saturación, la reacción de oxidación puede dar lugar a N-acilo saturado o no saturado de distintas longitudes (en función de si uno o todos los sitios no saturados se oxidaron, respectivamente, y de la ubicación de los dobles enlaces) comprendiendo, sin embargo, cada fracción un grupo aldehído activo en el terminal de la cadena principal alifática.

30 **[0046]** El polisacárido u oligosacárido de la invención se conjuga con una proteína portadora mediante cualquier método descrito en el presente documento y/o conocido en la técnica (p. ej., aminación reductiva) para generar un glicoconjugado inmunogénico. Un flujograma esquemático de un método general se muestra en la figura 1.

**[0047]** La exposición se refiere a oligosacáridos o polisacáridos microbianos no saturados derivados de N-acilo de la Fórmula I:

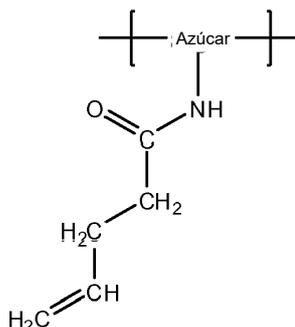


35 donde R<sub>1</sub> es una fracción alquilo no saturada C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, o C<sub>11</sub> que comprende al menos un carbono no saturado y el [azúcar] representa el dicho uno o más aminoazúcares del polisacárido u oligosacárido. En determinados modos de realización, dicho uno o más aminoazúcares es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido. En otros modos de realización, el dicho uno o más aminoazúcares no es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido. Si bien la invención abarca R<sub>1</sub> que comprende múltiples carbonos no saturados (esto es, múltiples dobles enlaces), según los métodos proporcionados en el presente documento, R<sub>1</sub> sólo necesita tener un único carbono no saturado (esto es, un único doble enlace; dicho doble enlace no se encuentra entre C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> de R<sub>1</sub>). En un determinado modo de realización de la exposición, R<sub>1</sub> de la Fórmula I es una fracción alquilo no saturada C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub> o C<sub>11</sub>, que comprende un único doble enlace. En un modo de realización adicional de la invención, R<sub>1</sub> de la Fórmula I es una fracción alquilo no saturada C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub> o C<sub>11</sub>, y la posición del doble enlace se sitúa entre los dos carbonos terminales de la cadena alifática.

50 **[0048]** En modos de realización específicos, la fracción N-acilo no saturada se oxida a un grupo aldehído (en el terminal de la cadena principal de la fracción alquilo) para servir como enlace en la conjugación de un compuesto con la proteína portadora. El grupo aldehído en la fracción N-acilo puede, a continuación, enlazarse con la proteína portadora mediante cualquier método de conjugación conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento, por ejemplo, mediante aminación reductiva.

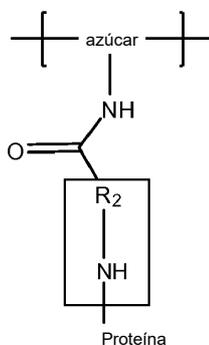
[0049] En todavía otro modo de realización adicional, el grupo amino (=NH) está enlazado a un residuo de azúcar del oligosacárido o polisacárido en cualquier posición, incluidas 1, 2, 3, 4 o 5 del azúcar. Las estructuras de aminoazúcares se conocen en la técnica y, por lo tanto, la posición de dicho enlace puede determinarse de forma rutinaria. Por ejemplo, donde el aminoazúcar es GlcNac, el grupo N-acetilo del azúcar está en el carbono 2; donde el aminoazúcar es ácido siálico, el grupo N-acetilo del azúcar está en el carbono 4.

[0050] Un ejemplo no limitativo de los polisacáridos modificados, por ejemplo, polisacáridos derivados de N-acilo de la Fórmula I útiles en la presente invención es el polisacárido derivado N-pentenoilado, que contiene al menos un grupo N-pentenoilo ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ ), como se muestra en la Fórmula III a continuación:



10 donde el grupo N-pentenoilo sirve como enlace a la proteína conjugada.

[0051] Se puede emplear cualquier modo de conjugación para conjugar el oligosacárido o polisacárido modificado con la proteína portadora. Un método de ejemplo, que se basa en la presencia de grupos hidroxilo vecinales terminales para formar un grupo aldehído activo, se describe en la patente estadounidense con n.º 4,356,170 ("la patente '170). La patente '170 describe la introducción de un grupo aldehído terminal en polisacárido y el acoplamiento de los grupos aldehídos a los grupos amino de proteína mediante aminación reductiva. El polisacárido y la proteína se enlazan de esta manera a través del grupo, como se muestra a continuación (en el cuadrado) en la Fórmula II:



20 donde  $R_2$  es una fracción alquilo saturada  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$ ,  $C_8$ ,  $C_9$ , o  $C_{10}$ , y donde el NH fuera del cuadrado (en el cuadrado) pertenece al uno de los grupos  $\text{NH}_2$  primarios de la proteína (por ejemplo, residuos de lisinila o residuos de arginila). El [azúcar] de la Fórmula II representa el dicho uno o más aminoazúcares del polisacárido u oligosacárido. En determinados modos de realización, dicho uno o más aminoazúcares es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido. En otros modos de realización, el dicho uno o más aminoazúcares no es un componente de la unidad repetitiva del polisacárido u oligosacárido.

25 [0052] Los conjugados proteína-polisacárido N-acilados resultantes de la invención se han sometido a ensayo en *in vivo* en ratones, y en general han mostrado poseer propiedades inmunogénicas mejoradas en comparación con el polisacárido N-propionilado conocido en la técnica anterior (p. ej., los descritos en la patente estadounidense con n.º 5,902,586). En consecuencia, se espera que las vacunas de la invención sean útiles contra la meningitis provocada por *N. meningitidis* grupo B o por los organismos *E. coli* K1. Son de especial  
30 interés las vacunas para la protección de sujetos que presentan un riesgo mayor de contraer infecciones bacterianas (p. ej., meningitis bacteriana), por ejemplo, individuos que presentan deficiencias inmunitarias e infantes.

[0053] En modos de realización específicos no limitativos de la invención, puede ser deseable incluir más de una especie de oligosacárido o polisacárido y/o más de una proteína portadora con el fin de optimizar la respuesta inmunitaria. Dicho enfoque puede ser especialmente ventajoso en la prevención o el tratamiento de las infecciones caracterizadas por el rápido desarrollo de mutaciones que den lugar a la evasión de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, las infecciones protozoarias. Además, un glicoconjugado inmunogénico de la invención puede incluir más de un dominio inmunogénico/antigénico y/o más de un epítipo. Por ejemplo, la invención abarca conjugados polivalentes donde al menos dos polisacáridos u oligosacáridos distintos que son específicos para distintos antígenos se conjugan con una única molécula portadora y/o donde dos polisacáridos u oligosacáridos distintos que son específicos para distintos antígenos se combinan en una única molécula de polisacárido u oligosacárido conjugada con una proteína portadora. La invención también abarca conjugados que comprenden una pluralidad de polisacáridos u oligosacáridos y una pluralidad de proteínas portadoras. Puesto que los métodos de la invención generan al menos un sitio activo y preferiblemente múltiples sitios activos por molécula de polisacárido u oligosacárido, el polisacárido u oligosacárido puede estar enlazado de forma covalente a la proteína portadora en uno o más sitios; además, el polisacárido u oligosacárido pueden estar enlazados a una o más proteínas portadoras. En consecuencia, en determinados modos de realización, el conjugado es una red de moléculas de polisacárido y de proteínas portadoras.

[0054] El polisacárido u oligosacárido para su utilización en las composiciones de glicoconjugados de la invención pueden variar en tamaño. Como se define en el presente documento, un oligosacárido para su utilización en la presente invención comprende al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 unidades repetitivas (por ejemplo, residuos de azúcar) y preferiblemente desde 10 hasta aproximadamente 50 unidades repetitivas. Un polisacárido, como se define en el presente documento, es mayor que 50 unidades repetitivas y puede ser tan grande como aproximadamente 600 hasta aproximadamente 2000 unidades repetitivas o mayor. En algunos casos, se desean constructos grandes para la mejora de la inmunogenicidad. Los métodos de la presente invención proporcionan la utilización de polisacáridos muy grandes puesto que pueden introducirse muchos sitios reactivos en un único polisacárido.

### 5.1 Polisacáridos y aislamiento de los mismos

[0055] Polisacáridos adecuados para su utilización en los modos de realización preferidos incluyen polisacáridos y oligosacáridos de bacterias encapsuladas. Los polisacáridos y oligosacáridos pueden ser de cualquier fuente, por ejemplo, pueden derivarse de bacterias de origen natural, bacterias creadas genéticamente o pueden producirse sintéticamente. Los polisacáridos y oligosacáridos pueden someterse a una o más etapas de procesamiento antes de la activación, por ejemplo, purificación, funcionalización, despolimerización mediante la utilización de condiciones moderadas de oxidación, desacetilación y similares. También pueden emplearse etapas de posprocesamiento, si se desea. Puede emplearse cualquier método adecuado conocido en la técnica para sintetizar, preparar y/o purificar polisacáridos y oligosacáridos adecuados.

[0056] Los polisacáridos y oligosacáridos para su utilización según los métodos de la invención incluyen, pero sin carácter limitativo, polisacáridos neumocócicos de, por ejemplo, Serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F; polisacáridos meningocócicos de Serotipos A, B, C, W135 e Y, polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b (fosfato de polirribosilribitol), polisacáridos estreptocócicos Grupo B de Serotipos III y V y polisacárido Vi de *Salmonella Typhi*. Otros polisacáridos de serotipos neumocócicos y estreptocócicos Grupo B, y serogrupos meningocócicos también son adecuados para su utilización en el presente documento, como son otros antígenos polisacáridos y oligosacáridos T-independientes normalmente, por ejemplo, los polisacáridos u oligosacáridos derivados de *streptococcus* del grupo A, estafilococos, enterococos, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus anthracis*. Si bien se prefieren especialmente los polisacáridos y oligosacáridos bacterianos, también pueden emplearse lipopolisacáridos y lipooligosacáridos bacterianos (gramnegativos) y sus derivados polisacáridos y oligosacáridos, así como polisacáridos y oligosacáridos virales.

[0057] Los polisacáridos se aíslan de cápsulas bacterianas mediante métodos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, en uno de estos métodos, bacterias tales como meningocócicas grupo B (cepa 981B) se cultivan a 37 °C en un fermentador utilizando 30 g de caldo Todd Hewitt (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) deshidratado por litro de agua destilada. Antes del crecimiento en fermentador, la cepa liofilizada se cultiva inicialmente en una palmaria a 37 °C en placas de agar sangre de oveja 5 % (v/v) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). A continuación, se transfieren las bacterias a 1,0 litro de caldo Todd Hewitt (como anteriormente) en un matraz Erlenmeyer que se agita a 37 °C durante 7 horas a 190 rpm. A continuación, se transfiere el inóculo al fermentador. Tras el crecimiento en fermentador (16 horas) se matan las bacterias mediante la adición de formalina a la concentración final de 0,75 %. Se eliminan las bacterias mediante centrifugación continua y se aísla el polisacárido del sobrenadante y se purifica esencialmente, como describe Bundle et al, J. Biol. Chem., 249, 4797-4801 (1974) excepto que la proteína se extrae mediante la agitación de una solución del polisacárido crudo con fenol frío (4 °C) 90 % en lugar de caliente (50-60 °C). El último proceso asegura que se produce una

forma de alto peso molecular del polisacárido, por ejemplo, una forma de alto peso molecular de polisacárido meningocócico grupo B (GBMP, por sus siglas en inglés).

[0058] En otros modo de realización específicos, los polisacáridos u oligosacáridos pueden aislarse de bacterias, por ejemplo, *E. coli* (018:K1:H7) (NRCC 4283), mediante cultivo a 37 °C en un fermentador que contiene infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) en una concentración de 37 g/litro en agua destilada. Los cultivos de trabajo pueden iniciarse a partir de soluciones madre liofilizadas mediante la reconstitución de soluciones madre y cultivo inicial en 50 ml de solución BHI (*supra*) en una matraz Erlenmeyer que se agita a 37 °C durante 7 horas a 200 rpm. A continuación, se transfiere el cultivo a 1,5 litros de BHI (como anteriormente) y se cultiva en las mismas condiciones que se describen anteriormente durante 7 horas. A continuación, se transfiere el inóculo al fermentador. El aislamiento y la purificación del polisacárido capsular de bacterias cultivado en las mismas condiciones, por ejemplo, *E. coli* K1, se puede llevar a cabo con cualquier método conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento.

[0059] Se observará que los procedimientos de aislamiento y purificación descritos anteriormente no son los únicos que pueden utilizarse, y que otros procedimientos publicados están disponibles, por ejemplo los descritos por Watson et al, *J. Immunol.*, 81, 331 (1958) y en la patente estadounidense citada anteriormente con n.º 4,727,136.

## 5.2 Sustitución de grupos N-acetilo en oligosacáridos o polisacáridos:

[0060] Los grupos N-acetilo en oligosacáridos o polisacáridos nativos pueden sustituirse para proporcionar un grupo amino reactivo en las partes de residuo de ácido siálico de la molécula. La sustitución puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido, por ejemplo, mediante un álcali, por ejemplo, en un medio acuoso básico a elevadas temperaturas, por ejemplo, aproximadamente 90 °C hasta 110 °C, y a un pH de aproximadamente 13 hasta 14. En determinados modos de realización, la sustitución abarca la desacetilación del grupo N-acetilo para formar un grupo amino primario. El medio acuoso básico puede comprender una solución de hidróxido de metal alcalino acuosa, por ejemplo, hidróxido de sodio de aproximadamente concentración 2M. De forma alternativa, puede utilizarse hidracina en solución acuosa. Ejemplos no limitativos de bases que pueden utilizarse según la presente invención son NaOH, KOH, LiOH, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KCN, Et<sub>3</sub>N, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, NaH, NaOMe, NaOEt o KOtBu. Bases tales como NaOH, KOH, LiOH, NaH, NaOMe o KOtBu se utilizan de forma más eficaz en un rango de 0,5 N-5,0 N. Bases tales como NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y KCN pueden utilizarse en concentraciones tan altas como permitan sus solubilidades. Bases tales como NH<sub>3</sub> o H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>H<sub>2</sub> pueden utilizarse en casi cualquier concentración incluyendo 100 %. Pueden utilizarse disolventes tales como agua, alcoholes (preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), dimetilsulfóxido, dimetilformamida o mezclas de estos y otros disolventes orgánicos. Las soluciones de base que comprenden agua son las más preferibles.

[0061] En modos de realización específicos, el intervalo de pH preferido para la sustitución de los grupos N-acetilo del polisacárido u oligosacárido es desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 14 siendo el pH óptimo alrededor de 12. Después de eso, el polisacárido N-sustituido se purifica a partir de reactivos residuales mediante ultrapurificación utilizando membranas o diálisis con métodos estándar conocidos en la técnica. El grado de sustitución de grupo N-acetilo puede variar desde una sustitución de al menos un grupo N-acetilo hasta e incluyendo una sustitución de 100 % de los grupos N-acetilo del oligosacárido o polisacárido. En determinados modos de realización, el grado de sustitución de grupo N-acetilo es aproximadamente 2 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 100 %. Preferiblemente, se sustituye 90 hasta 99 % de los grupos N-acetilo nativos. Los oligosacáridos o polisacáridos sustituidos se recuperan, por ejemplo, mediante enfriamiento, neutralización, purificación y liofilización. El análisis del alcance de la sustitución N-acetilo y la purificación de producto sustituido puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento. Por ejemplo, los oligosacáridos y/o polisacáridos pueden dializarse contra agua desionizada con una membrana Spectra/Por® Membrane MWCO:3.500 para la purificación/recuperación. El alcance de N-desacetilación puede analizarse mediante <sup>1</sup>H-RMN a 500 MHz con métodos conocidos en la técnica.

[0062] Antes del procedimiento de sustitución de grupo N-acetilo, los oligosacáridos o polisacáridos nativos tienen un amplio rango de pesos moleculares promedios, por ejemplo, en el campo de aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 1 000 000 daltones; dicho peso molecular promedio es sustancialmente reducido por la reacción de sustitución de grupo N-acetilo. Por ejemplo, el polisacárido meningocócico grupo B (GBMP, por sus siglas en inglés) tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 500 000 hasta aproximadamente 800 000 daltones; después de la sustitución de grupo N-acetilo según métodos de la invención, se producen

- normalmente fragmentos del polisacárido N-acetil-sustituido que tienen un peso molecular promedio que varía desde aproximadamente 3000 hasta aproximadamente 50 000 daltones. La longitud completa o los fragmentos de polisacáridos son de utilidad según los métodos de la invención. Por ejemplo, la longitud completa de los polisacáridos u oligosacáridos puede fragmentarse para producir tamaños más adecuados para su utilización en vacunas conjugadas. Por ejemplo, se emplea material N-acilado de peso molecular promedio de 10 000 hasta 40 000 daltones, preferiblemente, aproximadamente 10 000 hasta aproximadamente 15 000 daltones. Pueden obtenerse fragmentos de tamaño deseado mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo, por ejemplo, métodos de centrifugación o de filtración. En determinados modos de realización, pueden obtenerse fracciones de tamaños concretos o separación de un intervalo de peso molecular deseado mediante la utilización de una columna de fraccionamiento, por ejemplo, mediante la recopilación de fracciones del eluato de una columna de separación por tamaños (p. ej., un tamiz molecular) en el que se ha introducido el material inicial, por ejemplo, material GBMP N-acilado. En determinados modos de realización, se recopila material N-acilado de peso molecular promedio superior, por ejemplo en el campo de 30 000 hasta 40 000 daltones, para su utilización en los métodos de la invención.
- 15 **[0063]** A continuación, los fragmentos de polisacárido sustituidos por grupo N-acetilo o los polisacáridos de longitud completa se N-acilan para producir el producto N-acilado correspondiente. La N-acilación puede llevarse a cabo mediante la disolución de los polisacáridos sustituidos por grupo N-acetilo en un medio tamponado acuoso en condiciones básicas moderadas. Preferiblemente, dichas soluciones acuosas tamponadas moderadas tienen un pH de aproximadamente 7.5 hasta 9.0. A continuación, se añade el reactivo de acilo al sacárido que contiene solución y se enfría a menos de 10 °C hasta que se complete la reacción. El reactivo de acilo se selecciona en base al grupo alquilo deseado al finalizarse la conjugación, por ejemplo, el R<sub>2</sub> deseado en la Fórmula II. El sitio de no saturación del reactivo de acilo se oxidará a un aldehído activo y, por consiguiente, determinará la longitud de R<sub>2</sub>. Por ejemplo, el reactivo de acilo puede ser un anhídrido de acilo no saturado (por ejemplo, anhídrido de acetilo o anhídrido de propionilo) o un haluro de acilo no saturado (por ejemplo, cloruro de pentenoilo). La reacción se mezcla de forma opcional con un alcohol para incrementar la solubilidad. Si se desea, el medio de reacción puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Un ejemplo no limitativo de un método de purificación que puede utilizarse es diálisis seguida de recuperación del producto N-acilado mediante liofilización. La reacción está sustancialmente completa en aproximadamente 10 a 20 horas. A continuación, el grado de N-acilación de los grupos N-acetilo se determina mediante métodos analíticos conocidos en la técnica, por ejemplo, <sup>1</sup>H-RMN a alta resolución, por ejemplo, 500 MHz, y es preferiblemente al menos 90 % y más preferiblemente aproximadamente 100 %. La reacción de N-acilación no da lugar a ninguna reducción considerable del peso molecular de los fragmentos.

### 5.3 Proteínas portadoras

- 35 **[0064]** La proteína o las proteínas con las que se conjuga el polisacárido se eligen de modo que conviertan de manera adecuada una respuesta inmunitaria independiente de células T al componente sacárido de la vacuna en una que sea dependiente de células T. En determinados modos de realización de la invención, la proteína portadora puede ser toxina nativa o una toxina desintoxicada (esto es, toxoide). Además, pueden utilizarse también formas mutacionales no tóxicas de toxinas proteicas. Preferiblemente, dichas mutaciones retienen epítomos de la toxina nativa. Dichas toxinas mutantes se han denominado "proteínas interreactivas" o CRM (por sus siglas en inglés). CRM<sub>197</sub> tiene un único cambio de aminoácido de la toxina diftérica activa y es inmunológicamente indistinguible de la toxina activa. CRM<sub>197</sub> se ha utilizado ampliamente en infantes como un componente de una vacuna conjugada de *Haemophilus influenzae*.

- 45 **[0065]** El polisacárido u oligosacárido activado se acopla a una proteína para producir una vacuna conjugada. Proteínas adecuadas incluyen toxinas bacterianas que son portadores inmunológicamente eficaces que son seguras gracias a medios químicos o genéticos para la administración a un sujeto. Ejemplos incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como toxoide diftérico, CRM.sub.197, toxoide tetánico, toxoide *pertussis*, *E.coli* LT, *E.coli* ST y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden utilizarse proteínas bacterianas de la membrana exterior tales como complejo c de la membrana exterior (OMPC, por sus siglas en inglés), porinos, proteínas de unión a transferrina, neumólisis, proteína de superficie neumocócica A (PspA, por sus siglas en inglés), proteína de adhesina neumocócica (PsaA, por sus siglas en inglés) o proteínas de superficie neumocócica BVH-3 y BVH-11. Otras proteínas, tales como antígeno protector (PA, por sus siglas en inglés) de *Bacillus anthracis*, ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) y derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD, por sus siglas en inglés) pueden utilizarse también. Las proteínas son preferiblemente proteínas que son no tóxicas y no reactogénicas y se pueden obtener en cantidad y pureza suficiente que son susceptibles para los métodos de conjugación de los modos de realización preferidos. Por ejemplo, la toxina diftérica puede purificarse a partir de cultivos de *Corynebacteria diphtheriae* y desintoxicarse químicamente mediante la utilización de formaldehído para producir una proteína adecuada.

5 **[0066]** Ejemplos no limitativos de proteínas portadoras incluyen toxina/toxide tetánica/o, CRM<sub>197</sub>, Cα, proteína Cβ (por ejemplo, de *Streptococcus* del grupo B, incluyendo proteína C-β de no unión a IgA), toxide diftérico, hemolisina alfa o leucocidina de Pantón-Valentine (PVL, por sus siglas en inglés), proteínas de la membrana exterior de bacterias gramnegativas, por ejemplo, proteínas de la membrana exterior de *Neisseria meningitidis*, proteínas de alto peso molecular, P6 y P4 de *Haemophilus influenzae* no tipificable, CD y USPA de *Moraxella catarrhalis*, toxina/toxide diftérica/o, toxina/toxide A de *Pseudomonas aeruginosa* destoxificada/o, toxina/toxide del cólera, toxina/toxide *pertussis*, exotoxinas/toxide de *Clostridium perfringens*, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno central de la hepatitis B, proteína de rotavirus VP7, proteínas F y G del virus respiratorio sincitial, subunidad B de la toxina del cólera, neumoliside, toxide *pertussis*, proteína sintética que  
10 contiene residuos de lisina o cisteína y similares. La proteína portadora puede ser una proteína nativa, una proteína químicamente modificada, una proteína desintoxicada o una proteína recombinante. Con respecto al componente de proteína, las moléculas conjugadas preparadas según la presente invención pueden ser monoméricas, diméricas, triméricas y moléculas con mayor reticulación.

15 **[0067]** La presente invención da a conocer la capacidad de producir moléculas conjugadas donde una proteína portadora se enlace a un N-acetilo que contiene polisacárido u oligosacárido. El tamaño del polisacárido u oligosacárido puede variar en gran medida. Uno o una multiplicidad de polisacáridos u oligosacáridos puede reticularse con una o una multiplicidad de proteínas. Los conjugados de la presente invención son preferiblemente estructuras reticulares.

#### 5.4 El conjugado

20 **[0068]** En la técnica se conocen muchos métodos para conjugar un polisacárido activado, esto es, que comprende al menos una fracción, deben ser capaces de enlazarse de forma covalente a una proteína y son adecuados para su utilización en el presente documento. Por ejemplo, la patente estadounidense con n.º 4,356,170, concedida a Jennings, describe la conjugación de un polisacárido que comprende un grupo aldehído activo con una proteína portadora mediante aminación reductiva utilizando cianoborohidruro.

25 **[0069]** Los métodos de la invención permiten la generación de al menos un sitio activo y preferiblemente múltiples sitios activos (esto es, grupos aldehídos activos) por molécula de polisacárido u oligosacárido. Una molécula de polisacárido activada puede reaccionar con una o más proteínas portadoras y formar más de un enlace a una o varias de las mismas. Por consiguiente, en determinados modos de realización, el producto conjugado puede ser una mezcla de diversas estructuras reticulares o de tipo matriz reticuladas.

30 **[0070]** Tras la conjugación, el conjugado puede purificarse mediante cualquier método adecuado. La purificación se emplea para eliminar polisacáridos, proteínas o subproductos de reacción de moléculas pequeñas no reaccionados. Métodos de purificación incluyen ultrafiltración, cromatografía de exclusión por tamaños, centrifugación en gradiente de densidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, fraccionamiento con sulfato de amonio y similares, como se conocen en la técnica. En determinados modos de realización, puede no necesitarse purificación o puede ser deseable solamente un grado menor de purificación. El conjugado puede  
35 concentrarse o diluirse o procesarse en cualquier forma adecuada para su utilización en composiciones farmacéuticas, como se desee.

#### 5.5 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

40 **[0071]** Preferiblemente, una composición (p. ej., composición farmacéutica) incluye, al mezclarse, un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptables y uno o más de un agente bioactivo (p. ej., glicoconjugado, oligosacárido, polisacárido, polipéptido o péptido), como se describe en el presente documento, como ingrediente activo. La preparación de las composiciones farmacéuticas que contienen agentes bioactivos como ingredientes  
45 activos se conoce bien en la técnica. Normalmente, dichas composiciones se preparan como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas para su solución o suspensión en líquido antes de la administración. La preparación también puede emulsionarse. El ingrediente activo terapéutico, normalmente, se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo, por ejemplo, un potenciador de permeación. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, salino, dextrosa, glicerina, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Portadores preferidos, excipientes y diluyentes de la invención comprenden suero fisiológico (esto es, 0,9 % de NaCl). Además, si se desea, la  
50 composición puede contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH, que mejoran la efectividad del ingrediente activo.

**[0072]** Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármaco a granel útiles en la elaboración de composiciones farmacéuticas (p. ej., composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (esto es, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden utilizarse

en la preparación de formas de dosis unitaria. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico expuesto en el presente documento o una combinación de estos agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. En determinados modos de realización, las composiciones de la invención comprenden una cantidad inmunogénica de al menos un glicoconjugado inmunogénico y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable. En otros modos de realización, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de al menos un glicoconjugado inmunogénico y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

**[0073]** En un modo de realización específico, el término "farmacéuticamente aceptable" significa fisiológicamente compatible. Preferiblemente, farmacéuticamente aceptable significa aprobado por un organismo regulador del gobierno federal o de un estado o que esté enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para la utilización en animales y, más concretamente, en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, excipiente, potenciador de permeación (como se describe en la técnica anteriormente) o vehículo con el que se administra la terapia. Dichos portadores farmacéuticos incluyen, pero sin carácter limitativo, líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Excipientes farmacéuticos adecuados comunes incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerina, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerina, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

**[0074]** Las composiciones farmacéuticas de la invención que comprenden glicoconjugados inmunogénicos, como se establece anteriormente, se denominan en el presente documento "vacunas". El término vacuna se utiliza para indicar que las composiciones de la invención pueden utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica. Una vacuna de la invención puede comprender un glicoconjugado con un único dominio o epítipo antigénico, o un glicoconjugado con una pluralidad de dominios o epítipos antigénicos. Asimismo, una vacuna puede comprender una mezcla de glicoconjugados con un único dominio o epítipo antigénico o con pluralidades de dominios o epítipos antigénicos o con cualquier combinación de los anteriores. Las composiciones farmacéuticas que comprenden vacunas conjugadas de la invención pueden ofrecer diversas ventajas sobre las vacunas convencionales, incluyendo inmunogenicidad mejorada de antígenos poco inmunogénicos (p. ej., polisacáridos u oligosacáridos bacterianos), reducción potencial de la cantidad de antígeno utilizado, inmunizaciones de recuerdo menos frecuentes, eficacia mejorada, estimulación de inmunidad preferente o determinación potencial de respuestas inmunitarias.

**[0075]** Una composición de vacuna que comprende uno o más glicoconjugados inmunogénicos según la invención puede administrarse por vía cutánea, subcutánea, intradermal, intravenosa, intramuscular, parenteral, intrapulmonar, intravaginal, intrarrectal, nasal, oral o tópica. La composición de vacuna puede suministrarse mediante inyección, bombardeo de partículas, oralmente o mediante aerosol.

**[0076]** Las composiciones de vacuna de acuerdo con la invención también pueden incluir diversos materiales adicionales, tales como un portador farmacéuticamente aceptable. Portadores adecuados incluyen cualquier portador estándar farmacéuticamente aceptado, tales como solución salina tampón fosfato, agua, emulsiones tales como una emulsión aceite/agua o una emulsión de triglicéridos, diversos tipos de agentes humectantes, comprimidos, comprimidos recubiertos y cápsulas. Un ejemplo de una emulsión de triglicéridos aceptable útil en la administración intravenosa e intraperitoneal de los compuestos es la emulsión de triglicéridos conocida comercialmente como Intralipid.RTM. Normalmente, dichos portadores contienen excipientes tales como almidón, leche, agua, azúcar, determinados tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles u otros excipientes conocidos. Dichos portadores pueden incluir también aditivos de sabor y color u otros ingredientes.

**[0077]** La composición de vacuna de la invención puede incluir también diluyentes adecuados, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes (p. ej., fosfato, hidróxido o sulfato de aluminio) y/o portadores. Dichas composiciones pueden estar en forma de formulaciones líquidas o liofilizadas o desecadas de otro modo y pueden incluir diluyentes de diverso contenido de tampón (p. ej., acetato y fosfato Tris-HCl), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar absorción a superficies, detergentes (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), agentes solubilizantes (p. ej., glicerina, glicerina de polietileno) antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (p. ej., Thimesoral, alcohol bencílico, parabenos), sustancias de carga o modificadores de tonicidad (p. ej., lactosa, manitol, sorbitol) unión covalente de polímeros tales como polietilenglicol a la proteína, complejación con iones metálicos o incorporación del material en o sobre preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc. o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o

multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de depuración *in vivo*. La elección de composiciones dependerá de las propiedades físicas y químicas de la vacuna. Por ejemplo, un producto derivado de una forma limitada por membrana de un polisacárido y/o proteína portadora puede requerir una formulación que contiene  
 5 detergente. Composiciones controladas o de liberación sostenida incluyen formulación en depósitos lipofílicos (p. ej., ácidos grasos, ceras, aceites). Otros modos de realización de las composiciones de la invención incorporan revestimientos de protección de formas particuladas, inhibidores de la proteasa o potenciadores de permeación para diversas vías de administración incluidas intramuscular, parenteral, pulmonar, nasal y oral.

**[0078]** Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin carácter limitativo, las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídricos, fosfóricos, acéticos, oxálicos, tartáricos, etc. y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

**[0079]** Las composiciones de la invención, por ejemplo, las vacunas, pueden comprender también uno o más adyuvantes para mejorar la eficacia inmunogénica de la composición. El adyuvante utilizado puede ser cualquier adyuvante conocido en la técnica que sea adecuado para su utilización con vacunas basadas en polisacáridos (véase, p. ej., la patente estadounidense con n.º:5,773,007). Adyuvantes adecuados incluyen, pero sin carácter limitativo, formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como muramil péptidos o componentes de pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo (a) MF59. TM. (WO 90/14837; Chapter 10 in Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente MTP-PE) formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador, (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero L121 bloqueado por plurónico al 5 % y thr-MDP bien microfluidizado en una emulsión submicrónica o bien agitado en vórtex para generar una emulsión de tamaño de  
 20 partícula mayor y (c) sistema adyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de pared celular bacteriana tales como monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL-CWS (Detox.TM.). Otros adyuvantes incluyen adyuvantes de saponina (tales como QS21 o Stimulon. TM. (Cambridge Bioscience, Worcester, Mass.) o partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), ISCOM que pueden estar desprovistos de detergente adicional, por ejemplo el documento WO 00/07621); adyuvante completo de Freud (CFA) y adyuvante incompleto de Freud (IFA); citocinas (tales como interleucinas (p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636), etc.), interferones (p. ej., interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.); monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-Odeacilado (3dMPL) (p. ej., los documentos GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente en ausencia sustancial de alumbre cuando se utiliza con sacáridos neumocócicos, por ejemplo, el documento WO 00/56358); combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (p. ej., los documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231); oligonucleótidos que comprenden motivos CpG (Krieg Vaccine 2000, 19, 618-622; Krieg Curr opin Mol Ther2001 3:15-24; Roman et al., Nat. Med, 1997, 3, 849-854; Weiner et al., PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis et al, J. Immunol, 1998, 160, 810-876; Chu et al., J. Exp. Med, 1997, 186, 1623-1631; Lipford et al, Ear. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344; Moldoveami e/ al., Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg et al., Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman et al., PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas et al, J. Immunol, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery et al, J. Immunol, 1996, 156, 4570-4575; Halpern et al, Cell Immunol, 1996, 167, 72-78; Yamamoto et al, Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey et al, J. Immunol., 1996, 157,2116-2122; Messina et al, J. Immunol, 45 1991, 147, 1759-1764; Yi et al, J. Immunol, 1996, 157,4918-4925; Yi et al, J. Immunol, 1996, 157, 5394-5402; Yi et al, J. Immunol, 1998, 160, 4755-4761; y Yi et al, J. Immunol, 1998, 160, 5898-5906; las solicitudes de patente internacionales WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 y WO 98/52581] es decir, que contienen al menos un dinucleótido CG, donde la citosina no está metilada); un éter de polioxietileno o éster de polioxietileno (p. ej., el documento WO 99/52549); un tensioactivo de éster de sorbitán polioxietileno en combinación con un octoxinol (el documento WO 01/21207) o un éter de alquilo de polioxietileno o tensioactivo de éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (el documento WO 01/21152); una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante (p. ej., un oligonucleótido CpG) (el documento WO 00/62800); un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica (p. ej., el documento WO 00/23105); una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo, el documento WO 99/11241; una saponina (p. ej., QS21)+3dMPL+IM2 (opcionalmente+un estero) por ejemplo, el documento WO 98/57659; y/u otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición.

**[0080]** Las composiciones farmacéuticas pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, como se requiere para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes ajustadores y tamponadores de pH, agentes ajustadores de toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de  
 60

sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de antígeno en estas formulaciones puede variar en gran medida (p. ej., desde menos de aproximadamente 0,1 %, normalmente o al menos aproximadamente 2 % hasta 20 % o 50 % o más en peso) y se seleccionará fundamentalmente de acuerdo con los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares según el modo concreto de administración seleccionado y las necesidades del paciente. Las composiciones resultantes pueden adoptar la forma de una solución, suspensión, comprimido, pastilla, cápsula, polvo, gel, crema, loción, ungüento o aerosol.

**[0081]** Los conjugados preparados de acuerdo con el modo de realización preferido se administran a un sujeto en una dosis inmunológicamente eficaz en una forma adecuada para tratar y/o prevenir enfermedades infecciosas. El término "sujeto", como se utiliza en el presente documento, se refiere a animales, tales como mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos contemplados incluyen humanos, primates, perros, gatos, ovejas, reses, cabras, cerdos, caballos, ratones, ratas, conejos, cobayas y similares. El término "sujeto", "paciente" y "huésped" se utilizan de forma intercambiable. Como se utiliza en el presente documento, una dosis "inmunológicamente eficaz" de la vacuna conjugada es una dosis que es adecuada para provocar una respuesta inmunitaria. La dosificación concreta depende de la edad, el peso y el estado médico del sujeto que se ha de tratar, así como en el método de administración. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente las dosis adecuadas.

**[0082]** En la práctica de protocolos de inmunización para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades precisas, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de conjugado a un sujeto. Como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad eficaz" significa la cantidad total de agente terapéutico (p. ej., conjugado) u otro componente activo que basta para mostrar un beneficio significativo en el sujeto, por ejemplo, respuesta inmunitaria, tratamiento, curación, prevención o mejora potenciados de la condición médica pertinente (enfermedad, infección o similares) o un incremento del ritmo del tratamiento, prevención o mejora de dichas condiciones. Cuando se aplica "cantidad eficaz" a un agente terapéutico individual administrado solo, el término se refiere a ese agente terapéutico solamente. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes que dan lugar al efecto terapéutico, ya sea mediante administración en combinación, en serie o simultáneamente. Como se utiliza en el presente documento, la frase "administración de una cantidad eficaz" de un agente terapéutico significa que se trata al sujeto con dicho agente o agentes terapéuticos en una cantidad y durante un tiempo que bastan para inducir una mejora, y preferiblemente una mejora sostenida, en al menos un indicador que refleje la gravedad de la enfermedad, infección o trastorno.

**[0083]** Las vacunas conjugadas de la invención pueden administrarse como dosis única o en una serie que incluye una o más de recuerdo. Por ejemplo, un infante o un niño puede recibir una dosis única en una etapa temprana de la vida y, más tarde, recibir la administración de una dosis de recuerdo hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años después. La dosis de recuerdo genera anticuerpos de células B cebadas, es decir, una respuesta anamnésica. La vacuna conjugada provoca una respuesta primaria elevada de anticuerpos funcionales en infantes o niños, y es capaz de provocar una respuesta anamnésica tras una administración de recuerdo, lo que muestra que la respuesta inmunitaria protectora provocada por la vacuna conjugada es duradera.

**[0084]** Las vacunas de la invención pueden formularse en preparaciones líquidas para la administración, por ejemplo, por vía oral, nasal, anal, rectal, bucal, vaginal, peroral, intragástrica, mucosa, perlingual, alveolar, gingival, olfatoria o por mucosa respiratoria. Formas adecuadas para dicha administración incluyen suspensiones, jarabes y elixires. Las vacunas conjugadas también pueden formularse para la administración parenteral, subcutánea, intradermal, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, administración inyectable, liberación sostenida de implantes o administración mediante colirio. Formas adecuadas para dicha administración incluyen suspensiones y emulsiones estériles. Dichas vacunas conjugadas pueden mezclarse con un portador, diluyente o excipiente adecuados tales como agua estéril, suero fisiológico, glucosa y similares. Las vacunas conjugadas también pueden liofilizarse. Las vacunas conjugadas pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes emulsionantes o humectantes, agentes tamponadores de pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colores y similares, en función de la vía de administración y la preparación deseada. Pueden consultarse textos estándar, tales como "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins; 20th edition (Jun. 1, 2003) y "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co.; 18.sup.th and 19.sup.th editions (diciembre 1985, y junio 1990, respectivamente), para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación indebida. Dichas preparaciones pueden incluir agentes complejantes, iones metálicos, compuestos poliméricos tales como ácido poliacético, ácido poliglicólico, hidrogeles, dextrano y similares, liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos. Lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, pero sin carácter limitativo, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La presencia de dichos componentes adicionales puede influir en el estado físico, solubilidad, estabilidad, tasa de liberación *in vivo*, y tasa de depuración *in vivo* y, por consiguiente, se seleccionan según la aplicación deseada, de manera que las características del portador se ajusten a la vía de administración seleccionada.

**[0085]** Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferiblemente isotónicas con la sangre u otro fluido corporal del receptor. La isotonicidad de las composiciones puede obtenerse con la utilización de tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos orgánicos o inorgánicos. Se prefiere especialmente el cloruro de sodio. Pueden emplearse agentes tampón, tales como ácido acético y sales, ácido cítrico y sales, ácido bórico y sales, y ácido fosfórico y sales. Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer y aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y nutrientes, reforzadores electrólito (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares.

**[0086]** Las composiciones farmacéuticas y/o vacunas de la invención pueden administrarse a un sujeto que tiene riesgo de contraer una enfermedad o trastorno (p. ej., infección bacteriana) para prevenir o al menos detener de forma parcial el desarrollo de la enfermedad y/o un síntoma o complicación asociados con la misma. Las cantidades eficaces para utilización terapéutica dependerán de, por ejemplo, la composición del antígeno, el modo de administración, el peso y el estado general de salud del paciente, así como de la opinión del médico que prescriba los fármacos. Pueden administrarse dosis únicas o múltiples de las composiciones de antígeno en función de la dosificación y frecuencia requeridas y toleradas por el paciente y la vía de administración.

### 15 **5.5.1 Régimen de inmunización**

**[0087]** Las composiciones farmacéuticas y/o vacunas de la invención se le administran a un huésped de modo que proporcionen la producción de anticuerpos antipolisacárido o antioligosacárido selectivos, preferiblemente, con poca producción de autoanticuerpos en el huésped o con una producción no detectable.

**[0088]** En modos de realización concretos, las composiciones de vacuna descritas en el presente documento se administran en serie. En primer lugar, se administra una dosis inmunológicamente eficaz de una vacuna de la invención a un sujeto. Generalmente, la primera dosis se administra en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria (p. ej., células T de activación). En general, las cantidades para la inmunización inicial varían desde aproximadamente 0,001 mg hasta aproximadamente 1,0 mg por paciente de 70 kilogramos, más comúnmente desde aproximadamente 0,001 mg hasta aproximadamente 0,2 mg por paciente de 70 kilogramos, normalmente aproximadamente 0,005 mg hasta aproximadamente 0,015 mg por paciente de 70 kilogramos. Pueden utilizarse dosificaciones desde 0,001 hasta aproximadamente 10 mg por paciente al día, concretamente cuando no se administre el antígeno en el flujo sanguíneo, tal como en una cavidad corporal o en un lumen de un órgano. En la administración oral, nasal o tópica son posibles dosificaciones considerablemente superiores (p. ej., 10 a 100 mg o más).

**[0089]** Tras la administración de la primera dosificación de vacuna, se administra al sujeto una segunda dosis de la vacuna de la invención terapéuticamente eficaz después de haber cebado inmunológicamente al sujeto mediante la exposición a la primera dosis. La dosis de recuerdo puede administrarse días, semanas o meses después de la inmunización inicial, en función de la respuesta y la condición del paciente.

**[0090]** La existencia de una respuesta inmunitaria a la primera administración de vacuna puede determinarse mediante métodos conocidos (p. ej., mediante la obtención de suero del individuo antes y después de la inmunización inicial y la demostración de un cambio en el estado inmunitario del individuo, por ejemplo un ensayo de inmunoprecipitación o un ELISA o un ensayo bactericida o una inmunoelectrotransferencia o ensayo citométrico de flujo o similares) y/o demostración de que la magnitud de la respuesta inmunitaria a la segunda inyección es superior que la de animales de control inmunizados por primera vez con la constitución de la materia utilizada para la segunda inyección (p. ej., cebado inmunológico). El cebado inmunológico y/o la existencia de una respuesta inmunitaria a la primera administración de vacuna pueden obtenerse también mediante la espera de un periodo de tiempo después de que la primera inmunización que, según la experiencia anterior, constituye un tiempo suficiente para que se hayan dado una respuesta inmunitaria y/o un cebado, por ejemplo, 2, 4, 6, 10 o 14 semanas. Las dosificaciones de recuerdo de la segunda inmunización varían normalmente desde aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1,0 mg de antígeno, en función de la naturaleza del inmunógeno y la vía de inmunización.

**[0091]** En determinados modos de realización, se le administra al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de la tercera composición de vacuna después de haber cebado al individuo y/o de que se haya aumentado una respuesta inmunitaria a la segunda composición de vacuna. La tercera dosis de recuerdo puede administrarse días, semanas o meses después de la segunda inmunización, en función de la respuesta y la condición del sujeto.

**[0092]** La presente invención también contempla la utilización de una cuarta, quinta, sexta o mayor inmunización de recuerdo, mediante la utilización de las mismas formulaciones de vacuna o de diferentes formulaciones.

[0093] En determinados modos de realización, las composiciones de antígeno se le administran a un sujeto mamífero (p. ej., humano) que es inmunológicamente primitivo con respecto a la fuente bacteriana de los polisacáridos u oligosacáridos del inmunoconjugado. En un modo de realización concreto, el mamífero es un niño humano de alrededor de cinco años o más joven, y preferiblemente alrededor de dos años o más joven, y las composiciones de antígeno se administran en cualquiera o cualesquiera de los siguientes intervalos de tiempo: dos semanas, un mes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 meses, o un año o 15, 18 o 21 meses después del nacimiento, o a los 2, 3, 4 o 5 años de edad.

[0094] En los modos de realización preferidos, la administración a cualquier mamífero se inicia antes del primer signo de síntomas de enfermedad, o en el primer signo de exposición posible o real a la infección o enfermedad (p. ej. debido a la exposición o infección por *Neisseria* o *E. coli* K1).

[0095] Las composiciones de vacuna o farmacéuticas pueden administrarse de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se ha de administrar depende del sujeto que se ha de tratar, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de modulación requerido. Las cantidades eficaces de ingrediente activo requeridas para administrarse dependen de la opinión del médico y son específicas para cada individuo. Sin embargo, para los infantes humanos, una dosis terapéuticamente eficaz del glicoconjugado inmunogénico dentro de las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprende aproximadamente 5 a aproximadamente 7,5 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 10 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 12,5 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 15 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 17,5 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 20 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 25 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 35 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 40 µg, aproximadamente 5 a aproximadamente 45 µg, o aproximadamente 5 a aproximadamente 50 µg; y/o en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 2 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 3,5 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 4 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 6 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 7 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 8 µg, aproximadamente 1 a aproximadamente 9 µg, o aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg por kg de peso corporal.

[0096] Las composiciones de vacuna o farmacéuticas de la invención pueden administrarse en combinación con diversas vacunas que actualmente se utilizan o se encuentran en desarrollo, ya sea previstas para sujetos humanos o no humanos. Ejemplos de vacunas para sujetos humanos y dirigidas a enfermedades infecciosas incluyen la vacuna combinada de toxoide diftérico y tetánico; la vacuna de células enteras contra la tos ferina; la vacuna antigripal inactivada; la vacuna neumocócica 23 valente; vacuna contra el sarampión viva; vacuna contra las paperas viva; vacuna contra la rubéola viva; vacuna Bacillus de Calmette y Guérin (BCG) contra la tuberculosis; vacuna contra la hepatitis A; vacuna contra la hepatitis B; vacuna contra la hepatitis C; vacuna contra la rabia (p. ej., vacuna con células diploides humanas); vacuna contra la poliomielitis; vacuna meningocócica polisacárida; vacuna meningocócica cuadrivalente; vacuna contra el virus vivo de la fiebre amarilla; vacuna de células enteras muertas contra la tifoidea; vacuna contra el cólera; vacuna con virus inactivado contra la encefalitis B japonesa; vacuna contra el adenovirus; vacuna contra el citomegalovirus; vacuna contra el rotavirus; vacuna contra la varicela; vacuna anticarbuncosa; vacuna contra la viruela; y otras vacunas disponibles en el mercado y experimentales.

## 5.6 Caracterización y demostración de utilidad terapéutica

[0097] Diversos aspectos de las composiciones farmacéuticas de la invención se someten a ensayo preferiblemente *in vitro*, es decir, en un sistema de cultivo celular y, a continuación, *in vivo*, por ejemplo, en un organismo modelo animal, tal como un sistema de modelo de animales roedores, para la actividad terapéutica deseada antes de la utilización en humanos. Los ensayos que pueden utilizarse para analizar las probabilidades de generar una respuesta inmunitaria terapéutica a una composición de vacuna concreta se conocen en la técnica.

[0098] Combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden someterse a ensayo en sistemas de modelos animales adecuados antes de su utilización en humanos. Dichos sistemas de modelos animales incluyen, pero sin carácter limitativo, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede utilizarse cualquier sistema animal conocido en la técnica. En un modo de realización específico de la invención, se someten a ensayo combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema de modelo de ratón. Pueden administrarse de forma repetida agentes profilácticos y/o terapéuticos. Diversos aspectos del procedimiento pueden variar, tal como el régimen temporal de la administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos, y si dichos agentes se administran de forma separada o como una mezcla.

## 5.7 Estudios de toxicidad

5 **[0099]** La toxicidad y/o la eficacia de las composiciones de la presente invención pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD50/ED50. Se prefieren las terapias que muestran altos índices terapéuticos. Si bien pueden utilizarse las terapias que muestran efectos secundarios tóxicos, debería tenerse cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirija dichos agentes al lugar de tejido dañado con el fin de minimizar los posibles daños a células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

10 **[0100]** Los datos obtenidos a partir de estudios animales pueden utilizarse en la formulación de un rango de dosificación de las terapias para la utilización en sujetos. La dosificación de dichos agentes se sitúa preferiblemente en una franja de concentraciones que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo en función de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier terapia utilizada en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente a partir de ensayos animales. Puede formularse una dosis en modelos animales para obtener un intervalo de concentración administrado que incluye la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que obtiene una inhibición media máxima de los síntomas) como se determina en los modelos de animales. Dicha información puede utilizarse para determinar de forma más precisa dosis útiles en sujetos (p. ej., humanos).

## 20 5.8 Kits

25 **[0101]** La invención también abarca kits, que tienen una dosis unitaria de la composición presente en una forma de almacenamiento estable, que se puede disolver o diluir hasta la dosificación deseada junto con dispositivos de embalaje y de manipulación adecuados para facilitar la mezcla y para mantener la esterilidad antes de su instilación. Dicho kit puede incluir, por ejemplo, un primer recipiente que contiene ingrediente activo en una forma de almacenamiento estable, como una dosis unitaria en una solución madre o una dosis unitaria como polvo liofilizado; y un segundo recipiente que contiene diluyente o solvente y diluyente, por separado o en combinación, cuyo volumen proporcionará una dosis unitaria de compuesto terapéutico en un volumen adecuado para la administración; medios para combinar diluyente con la solución madre o polvo liofilizado; y, opcionalmente, medios para administrar la dosis al paciente. Medios para transferir diluyente a la solución madre o polvo liofilizado pueden incluir, pero sin carácter limitativo, jeringas o recipientes multicámara que tienen un cierre interno que puede romperse que separa el ingrediente activo del diluyente.

35 **[0102]** La invención da a conocer un pack o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de la composición farmacéutica de la invención o de una porción de la misma. Adicionalmente, también pueden incluirse en el pack o kit farmacéutico uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. La invención da a conocer también un pack o kit farmacéutico que comprenden uno o más recipientes llenos de uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. De forma opcional, puede haber una nota asociada con dicho o dichos recipientes en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, utilización o venta de productos farmacéuticos o biológicos; dicha nota refleja la aprobación del organismo de fabricación, utilización o venta para la administración humana.

40 **[0103]** Por lo general, los ingredientes de las composiciones de la invención se suministran por separado o mezclados en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. En determinados modos de realización, las composiciones de la invención también comprenden agentes de carga, tales como cloruro de sodio, manitol, polivinilpirrolidona y similares, para proporcionar suficiente materia para facilitar la manipulación tras la liofilización.

**[0104]** La presente invención da a conocer kits que pueden utilizarse en los métodos anteriores. En un modo de realización, un kit comprende una o más composiciones farmacéuticas de la invención. En otro modo de realización, un kit también comprende uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad infecciosa o síntoma asociado a la misma, en uno o más recipientes.

50 **[0105]** Si bien se ha expuesto la invención mediante ejemplos de modos de realización específicos, otros modos de realización, métodos, composiciones, ingredientes activos, indicaciones, composiciones y kits serán evidentes para los expertos en la materia. Todas dichas alteraciones y extensiones se incluyen con la invención, como se expone y se reivindica en el presente documento.

## 6. EJEMPLOS

### 6.1 EJEMPLO I: Conjugación:

[0106] La figura 1 presenta un flujograma esquemático del método generalizado de la invención. Al menos uno de los grupos N-acetilo (por ejemplo, de GlcNAc, ManNAc, GalNAc y ácido siálico) en un polisacárido se sustituye por una fracción N-acilo para formar el compuesto de la Fórmula I con la utilización de un álcali, seguido de N-pentenoilación (con la utilización de una cadena alifática no saturada de 5 carbonos). A continuación, el compuesto acilado resultante se oxida para generar grupos aldehídos activos en el sitio no saturado de los grupos pentenoilos. El compuesto oxidado, a continuación, se conjuga con una proteína portadora mediante aminación reductiva del polisacárido activado, generando el glicoconjugado inmunogénico. Puede mostrarse la inmunogenicidad del producto mediante la utilización de un modelo animal (*infra*).

[0107] Para todos los experimentos, se analizó el progreso de la conjugación con un sistema biológico (Bio-Rad) equipado con una columna superose 12. Se indicó la conjugación del polisacárido con la proteína antigénica a través del incremento progresivo en un pico, monitorizado por la medición de la absorbancia UV a 280 nm, con elución en el volumen nulo de la columna. Después de completarse la conjugación, se neutralizaron las soluciones a pH7 con 0,1N HCl y, a continuación, se dializó contra PBS. Se purificó el conjugado pasándolo sobre una columna de Superdex 200 PG (Pharmacia) de 1,6x60 cm y se eluyó con PBS que contenía 0,01 % de timerosal. Se agruparon fracciones correspondientes al pico de volumen nulo. Se calculó el contenido de carbohidratos y proteínas en el conjugado mediante el ensayo fenol-sulfúrico de Dubois et al. (51) y el ensayo Coomassie de Bradford (9).

### 6.2 EJEMPLO II. CONJUGADO POLISACÁRIDO-PROTEÍNA DE *STREPTOCOCCUS* DEL GRUPO A (GAS, por sus siglas en inglés)

#### Sustitución de una porción (35-40 %) de los grupos N-acetilo de polisacárido de GAS

[0108] Se trató polisacárido de GAS (30 mg/ml) en 0,012 N de NaOH con NaBH<sub>4</sub> (8 mg/ml) durante 75 min con agitación a temperatura ambiente ((TA) aproximadamente 20-25 °C). Se añadieron 3 N de NaOH (1/2 del volumen de 0,012 N de NaOH) a la mezcla de reacción con agitación para obtener una concentración final de polisacárido de GAS de 20 mg/ml. A continuación, se mantuvo la mezcla de reacción a 80 °C durante 1 h. A continuación, se enfrió a TA y se diluyó con agua a una concentración final de polisacárido de GAS de 4 mg/ml. Se diafiltró contra agua utilizando membrana de celulosa regenerada 3K en una célula con agitación. Se utilizó un volumen 15x de agua para la diafiltración para obtener una concentración de GAS de 24 mg/ml. El grado de sustitución de grupos N-acetilo por grupos amino primarios se monitorizó mediante espectroscopia <sup>1</sup>H-RMN.

#### N-acilación (por ejemplo, N-pentenoilación) (15-25 %) de polisacárido de GAS sustituido por grupo N-acetilo:

[0109] Se añadió 4-cloruro de pentenoilo (1ml/100 mg de polisacárido) en 1,4 dioxano (1 ml/ml de 4-cloruro de pentenoilo) gota a gota a una solución de polisacárido de GAS sustituido por grupo N-acetilo (24 mg/ml) durante un periodo de 75 min con agitación a TA. El pH de la solución se mantuvo entre 6.8 y 9.5 mediante la adición gota a gota de 3 N de NaOH. El pH de la mezcla de reacción se elevó a 12.7 mediante la adición gota a gota de 3 N de NaOH y se agitó a TA durante 45 min. A continuación, el pH de la mezcla de reacción se disminuyó a 7.7 mediante la adición gota a gota de 1 N de HCl a TA. La mezcla de reacción se diluyó con agua a una concentración final de 4 mg/ml de polisacárido de GAS y se diafiltró utilizando membranas 3K en una célula con agitación utilizando agua. Se recogió un 10x de volumen de agua como filtrado. Finalmente, el retenido se concentró a una concentración de polisacárido de 24 mg/ml y se almacenó a -20 °C.

#### Terminación de cadena opcional (por ejemplo, N-acetilación) del polisacárido de GAS sustituido por grupo N-acetilo (por ejemplo, N-pentenoilado) (véase la figura 2):

[0110] Se añadió anhídrido acético (0,6 ml/100 mg de polisacárido) gota a gota a una solución agitada de polisacárido de GAS N-pentenoilado (24 mg/ml) durante un periodo de 75 min a TA. El pH de la solución se mantuvo entre 6.8 y 9.5 mediante la adición gota a gota de 3 N de NaOH. A continuación, el pH de la mezcla de reacción se elevó a 12.7 mediante la adición gota a gota de 3 N de NaOH y se agitó a TA durante 60 min. A continuación, el pH de la mezcla de reacción se disminuyó a 7.7 mediante la adición gota a gota de 1 N de HCl a TA. La mezcla de reacción se diluyó con agua a una concentración final de 4 mg/ml de polisacárido de GAS y se diafiltró utilizando membranas 3K en una célula con agitación utilizando agua. Se recogió un 15x de volumen de agua como filtrado. Finalmente, el retenido se concentró a una concentración de polisacárido de 24 mg/ml y se almacenó a -20 °C. Se calculó la incorporación de grupos pentenoilo en los polisacáridos mediante análisis <sup>1</sup>H-RMN 600 MHz (véase la figura 3).

Oxidación del polisacárido de GAS sustituido por grupo N-acilo (por ejemplo, N-pentenoilado) (véase la figura 2):

**[0111]** Se añadió metanol (1/2 el volumen de la solución de polisacárido) lentamente a una solución agitada de polisacárido de GAS N-pentenoilo en agua (24 mg/ml) a TA. La mezcla se enfrió a entre aproximadamente -15 y -20 °C mediante la utilización de un baño de etanol-hielo seco. Se hizo borbotear ozono (generado a partir del aire mediante la utilización del ozonizador Ozomax 1) en la mezcla de reacción lentamente agitada durante 40 min manteniendo la temperatura de -15 a -20 °C. A continuación, se hizo borbotear nitrógeno en la mezcla durante 10 min para expulsar el exceso de ozono. A continuación, se diluyó la reacción con agua a una concentración final de 5 mg/ml de polisacárido y se diafiltró utilizando membranas 3K en una célula con agitación utilizando agua. Se recogió 25x el volumen de agua como filtrado y se concentró el retenido a una concentración de polisacárido de 20 mg/ml. A continuación, se liofilizó para su utilización en la siguiente etapa.

Conjugación con toxoide tetánico/toxoide tetánico recombinante, fragmento C:

**[0112]** Se añadió polisacárido de GAS N-butiloxi (N-BuO) (96 mg/ml, 1 ml) (resultante de la oxidación de un polisacárido de GAS N-pentenoilo) en tampón fosfato 0,2 mM (pH 7.7) a una solución de toxoide tetánico (conc. 120 mg/ml, 0,25 ml) en tampón fosfato (pH 7.7). Se añadió cianoborohidruro de sodio (40 mg) a la solución y se agitó la mezcla de reacción para obtener una mezcla homogénea. Se incubó la mezcla de reacción a 37 °C durante 48 h con agitación suave. Tras 24 h, se añadieron otros 16 mg de cianoborohidruro de sodio y se dejó continuar la reacción durante otras 48 h. Tras 48 h, se añadieron otros 4 mg adicionales de cianoborohidruro de sodio y se dejó la reacción a 37 °C con agitación durante 24 h adicionales.

**[0113]** A continuación, se añadió una solución 5 % de borohidruro de sodio en 0,05 N de NaOH (0,5 ml) y se agitó suavemente a TA durante 1 h. Seguidamente, se añadió una solución de 1 N de ácido acético (0,72 ml en 3 partes) con agitación a TA. Se diluyó la reacción con PBS (pH 7.4) a 32 ml y se purificó en un sistema LabScale TFF mediante la utilización de una membrana 30K. Se recogió un 30x de volumen de filtrado. Se filtró el retenido (30 ml) a través de un filtro de 0,2 micras y se añadió una solución 10 % de timerosal en PBS (0,3 ml) a la solución de conjugado. La solución de conjugado se almacenó a 2-8 °C. En la tabla 1, se muestran composiciones de polisacárido-proteína de GAS.

**6.3 Ejemplo III. Conjugados polisacárido-proteína de meningococo B:**N-acilación (por ejemplo, N-pentenoilación) (15-25 %) de polisacárido meningocócico B sustituido por grupo N-acetilo:

**[0114]** Se añadió 4-cloruro de pentenoilo (1 ml/100 mg de polisacárido) en 1,4 dioxano (1 ml/ml de 4-cloruro de pentenoilo) gota a gota a una solución de polisacárido sustituido por grupo N-acetilo (24 mg/ml) durante 75 min con agitación a TA. El pH de la solución se mantuvo entre 6.8 y 9.5 mediante la adición gota a gota de 3 N de NaOH. A continuación, el pH de la mezcla de reacción se elevó a 12.7 mediante la adición gota a gota de 3 N de NaOH y se agitó a TA durante 45 min. A continuación, el pH de la mezcla de reacción se disminuyó a 7.7 mediante la adición gota a gota de 1 N de HCl a TA. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con agua a una concentración final de 4 mg/ml de polisacárido y se diafiltró utilizando membranas 3K en una célula con agitación utilizando agua. Se recogió un 10x de volumen de agua como filtrado. Finalmente, el retenido se concentró a una concentración de polisacárido de 24 mg/ml y se almacenó a -20 °C.

Terminación de cadena opcional (por ejemplo, N-propionilación) del polisacárido meningocócico B sustituido por grupo N-acetilo (por ejemplo, N-pentenoilado) (véase la figura 4):

**[0115]** Se añadió gota a gota una mezcla de etanol anhidro propiónico (2,5:1, 0,84 ml/100 mg de polisacárido) a una solución de polisacárido N-pentenoilado (24 mg/ml) durante 75 min con agitación a TA. El pH de la solución se mantuvo entre 6.8 y 9.5 mediante la adición gota a gota de 3 N de NaOH. A continuación, el pH de la mezcla de reacción se elevó a 12.7 mediante la adición gota a gota de 3 N de NaOH y se agitó a TA durante 60 min. A continuación, el pH de la mezcla de reacción se disminuyó a 7.7 mediante la adición gota a gota de 1 N de HCl a TA. La mezcla de reacción se diluyó con agua a una concentración final de 4 mg/ml de polisacárido y se diafiltró utilizando membrana 3K en una célula con agitación utilizando agua. Se recogió un 15x de volumen de agua como filtrado. Finalmente, el retenido se concentró a una concentración de polisacárido de 24 mg/ml y se almacenó a -20 °C. Se calculó la incorporación de grupos pentenoilo en los polisacáridos mediante análisis <sup>1</sup>H-RMN 600 MHz (véase la figura 5).

**50** Oxidación del polisacárido meningocócico B del grupo B (GBMP, por sus siglas en inglés) sustituido por grupo N-acilo (por ejemplo, N-pentenoilado) y opcionalmente con terminación de cadena (por ejemplo, N-propionilado)

(Véase la figura 4):

[0116] Se añadió metanol (1/2 el volumen de la solución de polisacárido) lentamente a una solución de GBMP N-pent-N-Pr en agua (24 mg/ml) con agitación a TA. A continuación, se enfrió la mezcla a entre aproximadamente -15 y -20 °C mediante la utilización de un baño de etanol-hielo seco. Se hizo borbotear ozono (generado a partir del aire mediante la utilización del ozonizador Ozomax 1) en la mezcla de reacción ligeramente agitada durante 40 min manteniendo la temperatura a aproximadamente -15 a -20 °C. A continuación, se hizo borbotear nitrógeno en la mezcla durante 10 min para expulsar el exceso de ozono. A continuación, se diluyó la reacción con agua a una concentración final de 5 mg/ml de polisacárido y se diafiltró utilizando membranas 3K en una célula con agitación con agua. Se recogió 25x el volumen de agua como filtrado y se concentró el retenido a una concentración de polisacárido de 20 mg/ml. A continuación, se liofilizó para su utilización en la siguiente etapa.

Conjugación con proteína meningocócica recombinante (rPorB)/proteína de la membrana exterior (OMPC, por sus siglas en inglés) de bacterias meningocócicas:

[0117] Se añadió GBMP activado N-butanoiloxi-(NbuO)N-Pr (N-But-[-CH=O]-N-Pr-GBMP, 17 mg/ml, 1 ml) en tampón HEPES (pH 8.5) a solución de rPorB/OMPC (conc. 15 mg/ml) en tampón HEPES (pH 8.5). La concentración final de la proteína y el polisacárido en la mezcla de reacción era 1:3. Se añadió cianoborohidruro de sodio (0,5 veces la masa del polisacárido) y se agitó la mezcla de reacción para asegurar una mezcla homogénea. Se incubó la mezcla de reacción a 37 °C durante 24 h con agitación suave. Tras 24 h, se volvió a añadir cianoborohidruro de sodio (0,125 veces la masa de polisacárido) y se continuó la reacción durante otras 48 h. Tras 48 h, se añadió una cantidad adicional de cianoborohidruro de sodio (0,032 veces la masa de polisacárido) a la mezcla y se mantuvo la reacción a 37 °C con agitación durante 24 h.

[0118] A continuación, se añadió una solución 5 % de borohidruro de sodio en 0,05 N de NaOH (0,2 x del volumen de reacción original) y se agitó ligeramente a TA durante 1 h. Se añadió una solución de 1 N de ácido acético (0,3 x del volumen de reacción original en 3 partes) con agitación a TA. Se diluyó la reacción con PBS (pH 7.4) a y, a continuación, se purificó en un sistema Labscale TFF mediante la utilización de una membrana 30K. Se recogió un 30x de volumen de filtrado. Se filtró el retenido a través de un filtro de 0,2 micras y se añadió una solución 10 % de timerosal en PBS (concentración final de timerosal 0,01 %) a la solución de conjugado. La solución de conjugado se almacenó a 2-8 °C. En la tabla 1, se muestran composiciones de conjugados polisacárido-proteína meningocócico B.

#### 6.4 EJEMPLO IV. CONJUGADO POLISACÁRIDO-PROTEÍNA DE MENINGOCOCO C:

[0119] Se llevó a cabo la sustitución de parte de los grupos N-acetilo, la acilación, oxidación y conjugación con proteína siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. En la tabla 1, se muestran las composiciones de conjugados polisacárido-proteína de meningococo C.

#### 6.5 EJEMPLO V. CONJUGADO POLISACÁRIDO-PROTEÍNA DE STREPTOCOCCUS TIPO III DEL GRUPO B:

[0120] Se llevó a cabo la activación y la conjugación polisacárido-proteína de *Streptococcus* tipo III del grupo B mediante procedimientos experimentales similares a los descritos anteriormente. En la tabla 1, se muestran las composiciones de conjugados polisacárido-proteína de *Streptococcus* tipo III del grupo B.

Tabla 1. Composición del conjugado polisacárido-proteína.

Conjugados	Polisacárido	Proteína	(%) de proteína en el conjugado	(%) de polisacárido en el conjugado
GASP-TT	Parcial-N-But-(CH=O)-GASP	Toxoide tetánico	57	43
GASP-rTT(C)	Parcial-N-But-(CH=O)-GASP	Toxoide tetánico recombinante (fragmento C)	70	30
B-rPorB meningocócico	N-But-(CH=O)-N-Pr-MenB	Por B recombinante	50	50
C-TT meningocócico	Parcial N-But-(CH=O)-MenC	Toxoide tetánico	57	43
TT de <i>Streptococcus</i> tipo III del grupo B	Parcial N-But-(CH=O)-GBSIII	Toxoide tetánico	60	40

**6.6 EJEMPLO VI. INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB C CON CONJUGADOS GASP-TT**

5 [0121] Los conjugados (10 µg/ml en tampón PBS) se formularon con gel anhidro (1 mg/ml). Se inyectaron suspensiones de solución de conjugado (200 µl, 2 µg equivalente de polisacárido conjugado) en gel anhidro en ratones Balb/c a intervalos de 2 semanas. Tras 3 inyecciones consecutivas, se recogieron muestras de sangre 1 semana después de la última inyección. Se separó el suero de la muestra y se cuantificaron los anticuerpos antipolisacárido en el suero sanguíneo mediante ELISA. En la figura 6, se muestran los resultados de la respuesta inmunitaria inducida por los conjugados de polisacárido-toxoide tetánico de *Streptococcus* del grupo A contra los polisacáridos en ratones Balb/c.

**6.7 EJEMPLO VII. INMUNIZACIÓN DE RATONES CD1 CON CONJUGADOS MENGB-RPORB:**

10 [0122] Los conjugados (10 µg/ml en tampón PBS) se formularon con gel anhidro (1 mg/ml). Se inyectaron suspensiones de solución de conjugado (200 µl, 2 µg equivalente de polisacárido conjugado) en gel anhidro en ratones CD1 a intervalos de 2 semanas. Tras 3 inyecciones consecutivas, se recogieron muestras de sangre 1 semana después de la última inyección y se separó el suero. Se determinaron anticuerpos específicos polisacáridos en el suero mediante ELISA. Se determinó la actividad bactericida del suero mediante la medición de la inhibición del crecimiento bacteriano en placa recubierta de agar chocolate en presencia de un suero. En la tabla 2, se muestra la actividad bactericida del suero generada por los conjugados de polisacárido-rPorB meningocócico B en ratones CD1.

20 [0123] La actividad bactericida del suero (ABS) de los sueros generada por 3 lotes separados de conjugados NPr-(NbuO)-GBMP-rPorB, lote 1 a lote 3, preparados según la invención, fue considerablemente superior después del sangrado en los días 42 y 52 que la ABS de los sueros generados a partir de los conjugados NPr-GBMP-rPorB, que se prepararon mediante aminación reductiva convencional de los terminales de cadena del ácido siálico (Véase la tabla 2). Se cree que los conjugados preparados según la invención logran una respuesta inmunitaria mejorada debido a la utilización de fracciones polisacáridas de tamaño relativamente mayor, que se activan en múltiples sitios a lo largo de la cadena de polisacárido y mejoran la reticulación de los conjugados.

25 Tabla 2. **Actividad bactericida del suero generada por los conjugados polisacárido-rPorB de meningococo B en ratones CD1.**

Conjugados	*ABS día 42	*ABS día 52
N-Pr-GBMP-rPorB	1090	1949
N-Pr (NBut)-GBMP-rPorB, lote 1	4753	8073
N-Pr-(NBut)-GBMP-rPorB, lote 2	2080	6154
N-Pr-(NBut)-GBMP-rPorB, lote 3	3373	4100
*Actividad bactericida del suero.		

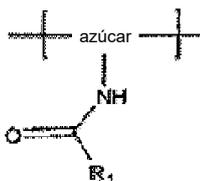
## REIVINDICACIONES

1. Un método de elaborar un glicoconjugado inmunogénico que comprende

- 5 a) sustituir al menos un grupo N-acetilo en un oligosacárido o polisacárido antigénico comprendiendo uno o más aminoazúcares sustituidos por N-acilo por una fracción N-acilo que comprende una fracción alquilo no saturada mayor que 5 carbonos, donde al menos un doble enlace se encuentra entre dos carbonos que no sean entre los carbonos 1 y 2 o entre los carbonos 2 y 3 de la fracción alquilo no saturada;
- 10 b) poner en contacto el oligosacárido o polisacárido sustituido con un agente oxidante para generar al menos un grupo aldehído activo en un sitio de no saturación de dicha fracción alquilo; y
- c) conjugar el oligosacárido o polisacárido a través del al menos un grupo aldehído activo con una proteína portadora,

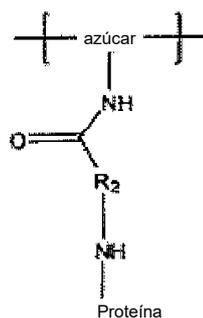
generando de esta manera un glicoconjugado inmunogénico.

- 15 2. El método según la reivindicación 1, donde dicha sustitución del al menos un grupo N-acetilo comprende, en primer lugar, des-N-acetilar el al menos un grupo N-acetilo de dicho oligosacárido o polisacárido antigénico para formar un oligosacárido o polisacárido que tiene al menos un aminoazúcar que comprende un grupo amino primario y, a continuación, unir dicha fracción N-acilo en dicho grupo amino primario.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, donde el grupo N-acetilo del oligosacárido o polisacárido se sustituye por un grupo N-acilo no saturado para formar la fórmula I:



donde R1 es una fracción alquilo no saturada C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, o C<sub>11</sub> y {azúcar} representa dicho uno o más aminoazúcares.

- 25 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el alquilo no saturado tiene 6 carbonos de longitud.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde un doble enlace se ubica entre los dos carbonos terminales de la fracción alquilo no saturada.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicha fracción alquilo no saturada tiene un doble enlace, dicho doble enlace se ubica entre los dos carbonos terminales de la fracción alquilo.
- 30 7. El método según la reivindicación 1 o 2, donde dicha fracción N-acilo está enlazada a dicho uno o más aminoazúcares en la posición 1, 2, 3, 4 o 5 de dicho uno o más aminoazúcares.
8. El método según la reivindicación 1 o 2, donde el oligosacárido o polisacárido está conjugado con la proteína portadora a través del grupo aldehído de la fracción N-acilo mediante aminación reductiva.
9. El método según la reivindicación 1 o 2, donde la proteína portadora y el oligosacárido o polisacárido del glicoconjugado están enlazados de forma covalente a través de un enlace como sigue:



donde R2 es una fracción alquilo saturada C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, o C<sub>10</sub>, donde el NH del enlace pertenece a un grupo NH<sub>2</sub> primario de la proteína, y donde {azúcar} representa dicho uno o más aminoazúcares.

- 5
10. El método según la reivindicación 1, donde el grupo N-acetilo se sustituye por un grupo N-pentenoilo, y donde el grupo N-pentenoilo sirve como enlace en la conjugación del compuesto con la proteína portadora.
11. El método según la reivindicación 1 o 2, donde el grupo N-acetilo es una fracción de dicho uno o más aminoazúcares, dicho uno o más aminoazúcares es uno o más de GlcNAc, ManNAc, GalNAc y ácido siálico.
- 10
12. El método según la reivindicación 1, donde el grupo N-acetilo se sustituye por una fracción N-acilo para formar la fórmula I mediante la utilización de un álcali.
- 15
13. El método según la reivindicación 1 o 2, donde la proteína portadora es toxina/toxoide tetánica/o, CRM197, proteínas de la membrana exterior de bacterias gramnegativas, P6 y P4 de *Haemophilus influenzae* no tipificable, CD y USPA de *Moraxella catarrhalis*, toxina/toxoide diftérica/o, toxina A de *Pseudomonas aeruginosa* destoxificada, toxina/toxoide del cólera, toxina/toxoide *pertussis*, exotoxinas/toxoide de *Clostridium perfringens*, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno central de la hepatitis B, proteína de rotavirus VP7 o proteínas F y G del virus respiratorio sincitial o una parte activa de los mismos.
- 20
14. El método según la reivindicación 1 o 2, donde el oligosacárido o polisacárido es un oligosacárido o polisacárido de una bacteria, donde la bacteria es *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Clostridium*, *Haemophilus*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria*, o *Escherichia*; o donde el oligosacárido o polisacárido es un polisacárido capsular derivado de estreptococos del grupo B, estreptococos del grupo A, *Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae*, o *Escherichia coli*; o donde dicho polisacárido capsular se deriva de: estreptococos del grupo B tipo Ia, Ib, II, III, V, VI o VIII, o de *Neisseria meningitidis* tipo B, C, Y, o W135; o de *S. pneumoniae* tipo III, IV, o XIV; o de *Escherichia coli* KI.
- 25
15. El método de la reivindicación 1 o 2, donde el glicoconjugado inmunogénico comprende al menos dos oligosacáridos o polisacáridos conjugados con una única proteína portadora y/o al menos dos proteínas portadoras conjugadas con un único oligosacárido o polisacárido.
- 30
16. Una composición farmacéutica que comprende el glicoconjugado inmunogénico según la reivindicación 1, 2 o 15 y un portador farmacéuticamente aceptable; comprendiendo opcionalmente también una pluralidad de oligosacáridos o polisacáridos; y/o comprendiendo además una pluralidad de proteínas portadoras; y/o comprendiendo una pluralidad de glicoconjugados inmunogénicos; y/o comprendiendo además uno o más adyuvantes.
- 35
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16 para su utilización en un método de inducción de una respuesta inmunitaria a uno o más tipos de bacterias, o para su utilización en un método de tratamiento o prevención de una infección bacteriana en un sujeto que la necesite.

Figura 1.

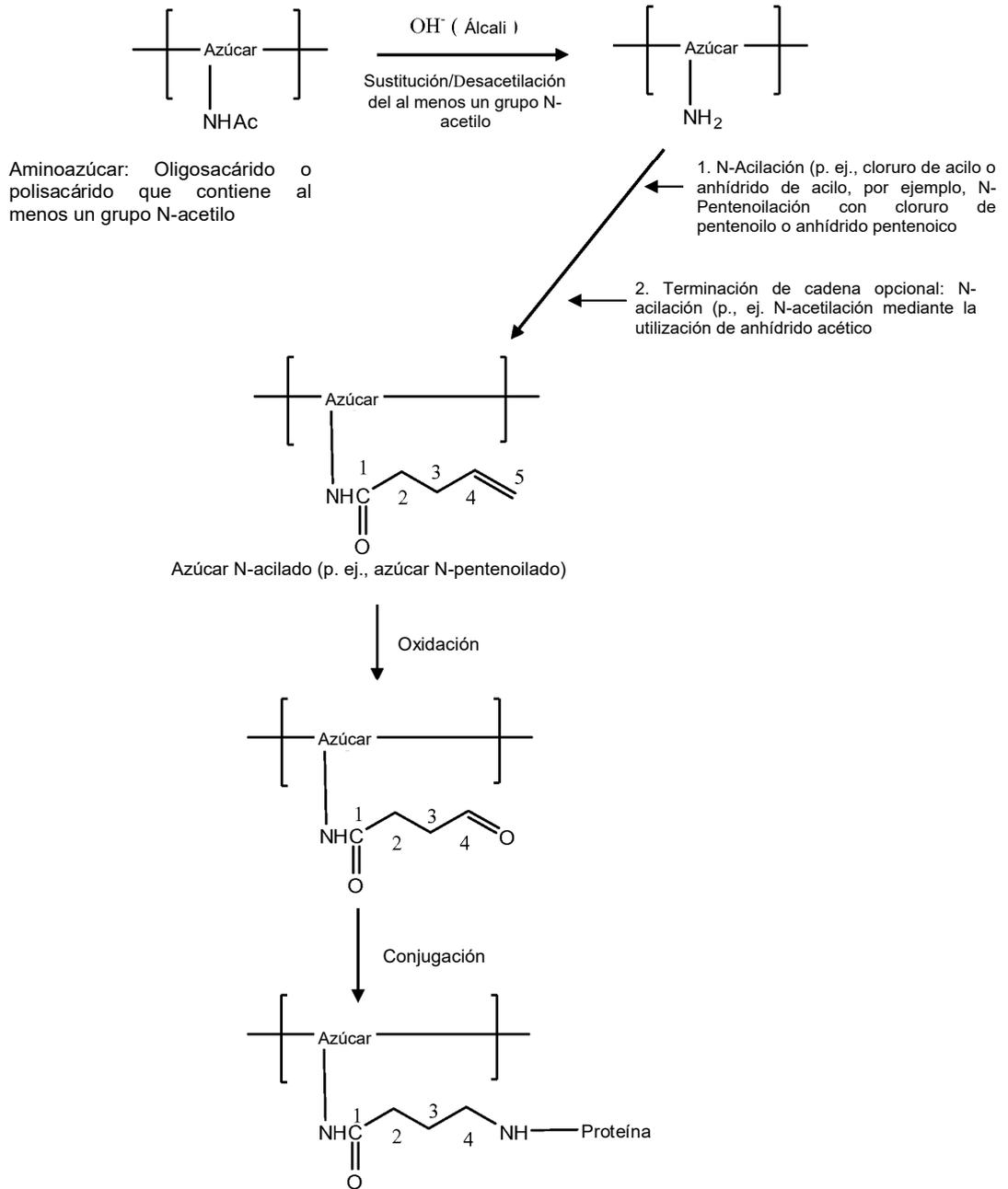


Figura 2.

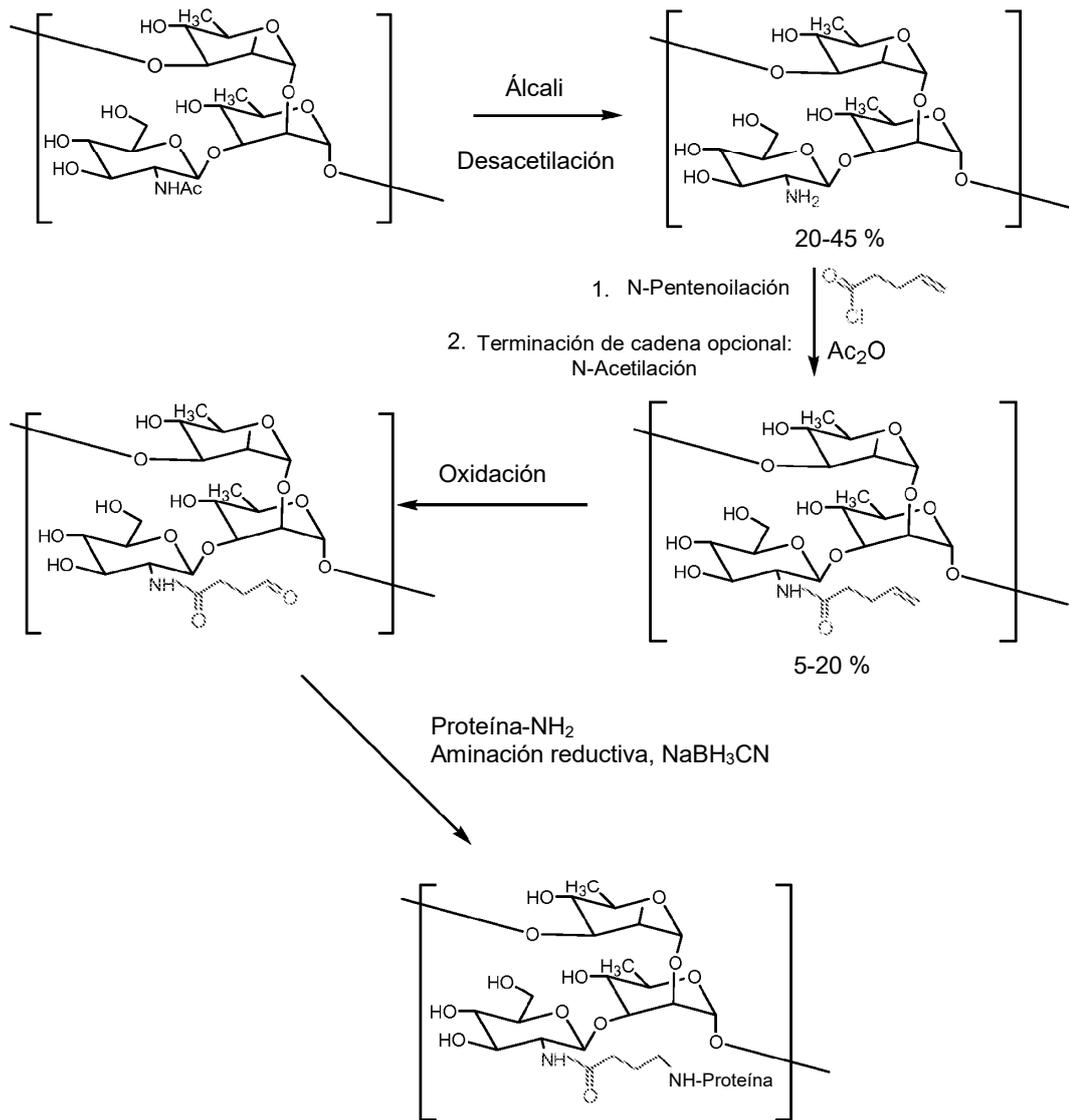


Figura 3.

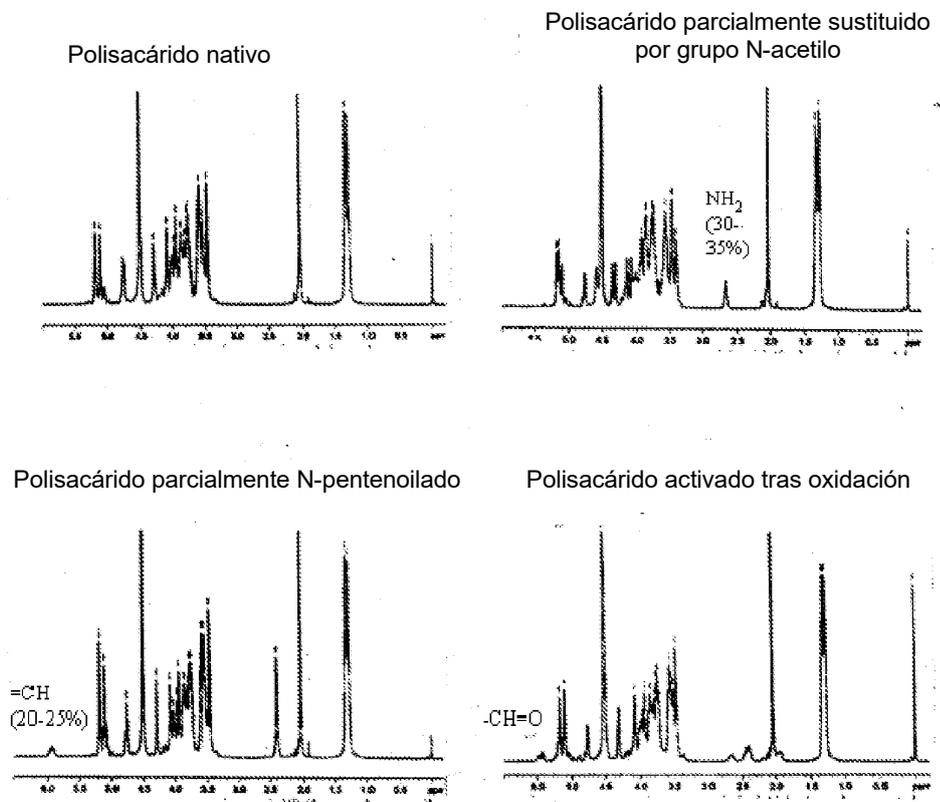


Figura 4.

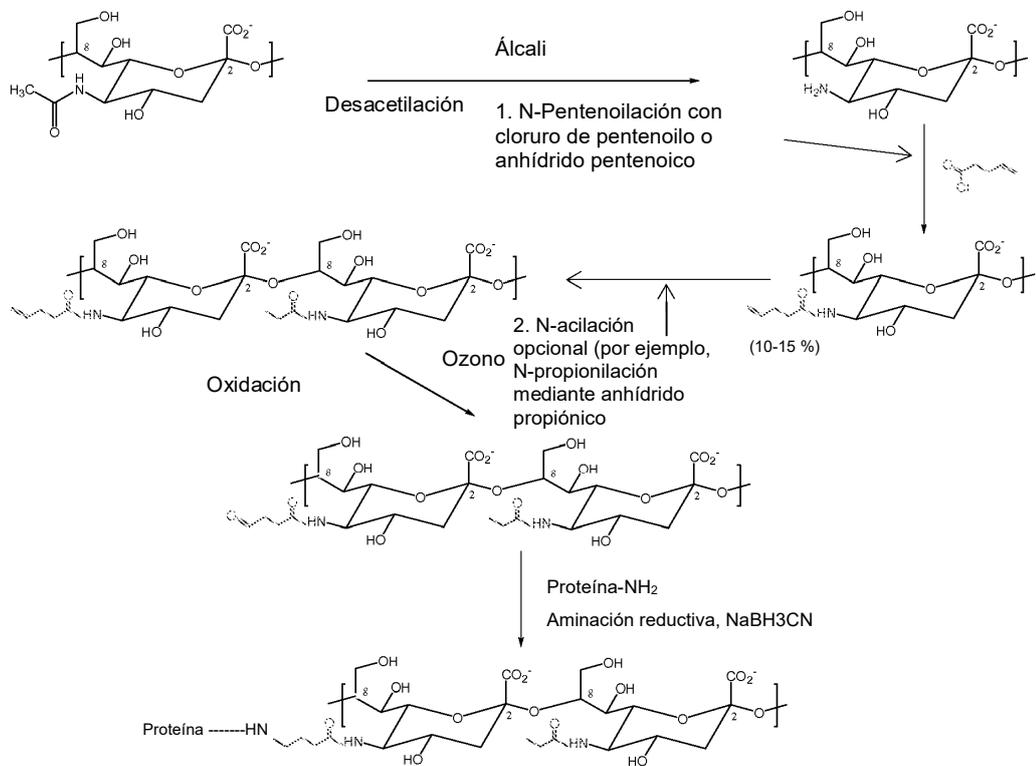


Figura 5.

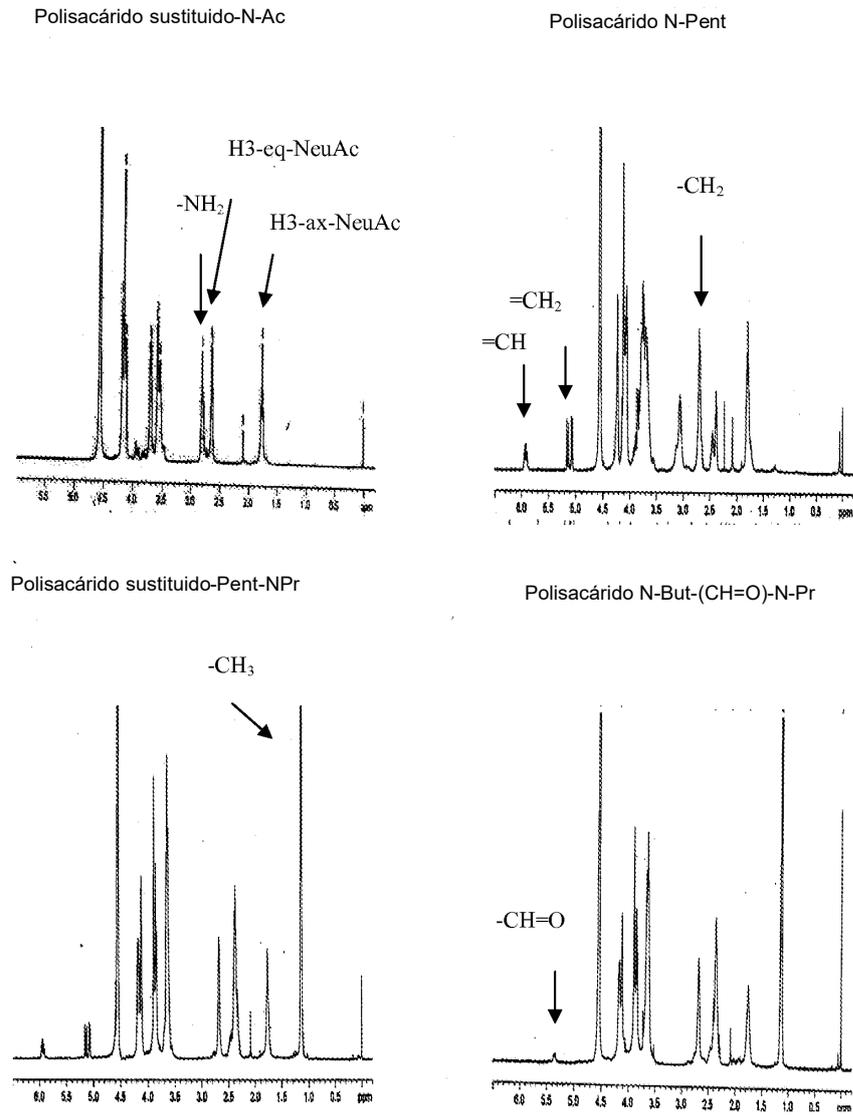


Figura 6.

