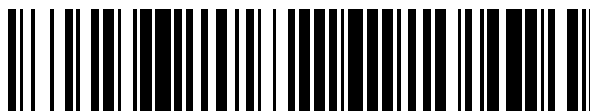


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 488**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

C07H 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2008 PCT/IB2008/001116**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2008 WO08084411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 08737594 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2118145**

54 Título: **Sacáridos modificados**

30 Prioridad:

11.01.2007 GB 0700562

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

04.10.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**BARDOTTI, ANGELA;
BERTI, FRANCESCO y
COSTANTINO, PAOLO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 635 488 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sacáridos modificados

Campo técnico

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

Técnica antecedente

El documento WO 2004/019992 se refiere a sacáridos modificados, a conjugados de los mismos y a su fabricación.

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

15 Para aumentar la inmunogenicidad de estos polisacáridos particularmente en niños, se desarrollaron vacunas conjugadas. Estas comprenden un polisacárido capsular conjugado con una proteína transportadora [por ejemplo, Referencias 1, 2, 3]. La conjugación puede convertir antígenos T-independientes en antígenos T-dependientes.

20 Un problema con muchos tipos de polisacáridos es una mala estabilidad en agua. La estabilidad de los polisacáridos en el agua puede depender de la naturaleza de los enlaces O-glicosídicos que unen las unidades de sacárido. Una escasa estabilidad en el agua es el resultado de que los enlaces O-glicosídicos se hidrolizan fácilmente en presencia de ácidos o glicosidasas. El polisacárido capsular del meningococo de serogrupo A es un ejemplo de un polisacárido que tiene poca estabilidad en agua.

25 La estabilidad de los polisacáridos es un problema particular en la fabricación de vacunas conjugadas. Con el fin de preparar un conjugado polisacárido-proteína, es necesario manipular grupos químicamente funcionales sobre el polisacárido para que el polisacárido pueda estar enlazado a una proteína. La exposición de un polisacárido a reactivos químicos en procedimientos para hacer esto, y particularmente a ácidos, puede dar como resultado una escisión indeseable de enlaces glicosídicos y la consiguiente fragmentación del polisacárido. Dicha fragmentación es altamente indeseable, provocando pérdidas en los rendimientos en la síntesis de conjugados polisacárido-proteína.

30 Los polisacáridos que son inestables de esta manera generalmente requieren una cuidadosa selección de reactivos y condiciones para eludir los problemas descritos anteriormente. Sin embargo, esto limita los reactivos disponibles para manipular el polisacárido, limitando así la gama de enlaces que pueden hacerse entre el polisacárido y la proteína transportadora. Además, la inestabilidad de estos polisacáridos hace que sea difícil desarrollar procedimientos robustos, que puedan utilizarse para preparar vacunas a escala industrial. La referencia 4 desvela un sacárido capsular modificado que comprende un grupo de bloqueo en una posición de grupo hidroxilo en al menos una de las unidades de monosacáridos del sacárido capsular nativo correspondiente. Se dice que el sacárido capsular modificado tiene una estabilidad mejorada a la hidrólisis. Un objeto de la invención es proporcionar sacáridos capsulares modificados o mejorados que tengan una estabilidad mejorada a la hidrólisis.

Divulgación de la invención

40 La invención se basa en el descubrimiento de que la modificación de grupos hidroxilo en unidades de monosacárido de sacáridos capsulares con grupos de bloqueo específicos ofrece una estabilidad mejorada. Los sacáridos modificados obtenidos mediante el procedimiento de la invención son más estables a la hidrólisis que sus equivalentes de sacáridos nativos.

45 Por lo tanto, la presente invención proporciona un sacárido capsular modificado que comprende un grupo de bloqueo en una posición de grupo hidroxilo en al menos el 80 % de las unidades de monosacáridos del sacárido capsular nativo correspondiente. El grupo de bloqueo se define a continuación. El sacárido capsular modificado de la presente invención es más estable a la hidrólisis que sus equivalentes de sacáridos nativos. Preferentemente, el sacárido capsular modificado de la presente invención retiene reactividad cruzada inmunológica con su equivalente de sacárido nativo.

50 La presente invención también proporciona procedimientos para modificar un sacárido capsular con el grupo de bloqueo; conjugados sacárido-proteína que comprenden el sacárido capsular modificado; procedimientos para preparar los conjugados sacárido-proteína, composiciones farmacéuticas que comprenden los sacáridos capsulares modificados y/o conjugados sacárido-proteína; y procedimientos y usos de los mismos.

Sacáridos modificados de la invención

La invención proporciona un sacárido capsular modificado que comprende un grupo de bloqueo en una posición de grupo hidroxilo en al menos el 80 % de las unidades de monosacáridos del sacárido capsular nativo

correspondiente. en el que el grupo de bloqueo tiene la fórmula (Ia) o (Ib):



en la que

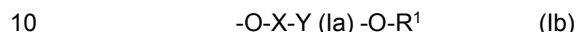
X es C(O);

5 Y es R³; y

R³ es alquilo C₁₋₆

en el que el sacárido capsular nativo correspondiente comprende unidades de monosacárido unidas por enlaces fosfodiéster.

También se describen en el presente documento grupos de bloqueo de fórmula (Ia) o (Ib):



en la que:

X es S(O) o SO₂;

Y es NR¹R²;

15 R¹ es alquilo C₁₋₆ sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidroxilo, sulfhidrilo y amina; y

R² es H o alquilo C₁₋₆.

20 Preferentemente, el grupo de bloqueo es de fórmula (Ia). En esta realización, se prefiere que X sea C(O). Dichos grupos de bloqueo carbamato y éster tienen un efecto estabilizador sobre el enlace glicosídico y pueden prepararse en condiciones moderadas. A continuación, se describen ejemplos de procedimientos para manipular un sacárido para proporcionar grupos de bloqueo de carbamato y éster. Sin embargo, la invención no se limita a sacáridos modificados preparados por los procedimientos ilustrados en el presente documento, y otros procedimientos para preparar sacáridos modificados de la invención serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

Tal como se describe en el presente documento, R² es H.

25 Tal como se describe en el presente documento, el alquilo C₁₋₆ de R¹ está sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidroxilo, sulfhidrilo y amina. Cuando el alquilo C₁₋₆ está sustituido con 2 o 3 grupos, las sustituciones pueden ser con el mismo grupo o grupos diferentes, aunque típicamente serán con el mismo grupo. Preferentemente, el alquilo C₁₋₆ de R¹ está sustituido con 1, 2 o 3 grupos hidroxilo.

30 Como se describe en el presente documento, R¹ puede estar sustituido en cualquier posición a lo largo de la cadena alquilo C₁₋₆. Preferentemente, al menos una sustitución está presente en el extremo distal de la cadena alquilo C₁₋₆. Cuando la cadena alquilo C₁₋₆ es un grupo alquilo de cadena lineal, esto significa que el alquilo C₁₋₆ está sustituido en C_x, en el que x es el número total de átomos de carbono en la cadena alquilo C₁₋₆. De forma similar, cuando la cadena alquilo C₁₋₆ es un grupo alquilo de cadena ramificada, esto significa que el alquilo C₁₋₆ está sustituido en el extremo distal de una de las ramificaciones, típicamente la ramificación más larga.

35 Tal como se describe en el presente documento, R¹ está sustituido con un grupo individual, siendo esta sustitución en el extremo distal de la cadena alquilo C₁₋₆, como se ha analizado anteriormente. Dichos grupos son particularmente eficaces al proporcionar una estabilidad mejorada a la hidrólisis. Preferentemente, el grupo individual es un grupo hidroxilo. Por lo tanto, los grupos preferidos incluyen hidroximetilo, 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo, 4-hidroxibutilo, 5-hidroxipentilo y 6-hidroxihexilo. Un grupo particularmente preferido es 2-hidroxietilo.

40 Tal como se describe en el presente documento, R¹ está sustituido con dos grupos adyacentes, es decir, dos grupos en posiciones adyacentes a lo largo de la cadena alquilo C₁₋₆. Dichos grupos son particularmente eficaces al proporcionar una estabilidad mejorada a la hidrólisis. Preferentemente, los dos grupos adyacentes están en el extremo distal de la cadena alquilo C₁₋₆. Cuando la cadena alquilo C₁₋₆ es un grupo alquilo de cadena lineal, esto significa que los dos grupos adyacentes están en C_x y C_{x-1} en los que x es el número total de átomos de carbono en la cadena alquilo C₁₋₆. De forma similar, cuando la cadena alquilo C₁₋₆ es un grupo alquilo de cadena ramificada, esto significa que los dos grupos adyacentes están en el extremo distal de una de las ramificaciones, típicamente la ramificación más larga. Preferentemente, los dos grupos adyacentes son grupos hidroxilo. Dichos grupos proporcionan un brazo para la conjugación a una molécula transportadora, como se analiza a continuación. Por lo tanto, los grupos preferidos incluyen 1,2-dihidroxietilo; 1,2-dihidroxipropilo y 2,3-dihidroxipropilo; 1,2-dihidroxibutilo, 2,3-dihidroxibutilo y 3,4-dihidroxibutilo; 1,2-dihidroxipentilo, 2,3-dihidroxipentilo, 3,4-dihidroxipentilo y 4,5-dihidroxipentilo; y 1,2-dihidroxihexilo, 2,3-dihidroxihexilo, 3,4-dihidroxihexilo, 4,5-dihidroxihexilo y 5,6-dihidroxihexilo.

Como se ha indicado anteriormente, se prefiere que los dos grupos adyacentes estén en el extremo distal de la cadena alquilo C₁₋₆. Por lo tanto, los grupos particularmente preferidos incluyen 1,2-dihidroxietilo, 2,3-dihidroxipropilo; 3,4-dihidroxibutilo, 4,5-dihidroxipentilo y 5,6-dihidroxihexilo. Un grupo particularmente preferido es 4,5-dihidroxipentilo.

- 5 Tal como se describe en el presente documento, el sacárido capsular modificado comprende al menos dos tipos de grupo de bloqueo (como se ha descrito anteriormente). Por ejemplo, se prefiere que el sacárido comprenda a) al menos un grupo de bloqueo en el que R¹ está sustituido con un único grupo, siendo esta sustitución en el extremo distal de la cadena alquilo C₁₋₆ (como se ha descrito anteriormente); y b) al menos un grupo de bloqueo en el que R¹ está sustituido con dos grupos adyacentes (como se ha descrito anteriormente). Dichos grupos de bloqueo mixtos son particularmente eficaces al proporcionar una estabilidad mejorada a la hidrólisis. Además, al incluir al menos un grupo de bloqueo en el que R¹ está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes, se proporciona un brazo para la conjugación con una molécula transportadora, como se analiza a continuación.

Preferentemente, R³ es alquilo C₁-C₃. Más preferentemente, R³ es alquilo C₁ (CH₃), también se prefieren alquilo C₂ y alquilo C₃.

- 15 Los grupos de bloqueo de fórmula -O-X-Y o -O-R¹ pueden prepararse a partir de grupos hidroxilo (por ejemplo, como se encuentran en la molécula nativa) por procedimientos de derivatización estándar, tal como reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, haluro de alquilo, haluro de sulfonilo, etc. Por lo tanto, el átomo de oxígeno en -O-X-Y es preferentemente el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo -X-Y en -O-X-Y preferentemente reemplaza el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo. Como alternativa, los grupos de bloqueo pueden ser accesibles a través de una reacción de sustitución, tal como una sustitución de tipo Mitsunobu. Estos y otros procedimientos de preparación de grupos de bloqueo a partir de grupos hidroxilo son bien conocidos.

Típicamente, los sacáridos modificados de la presente invención son oligosacáridos. Los oligosacáridos pueden obtenerse a partir de polisacáridos mediante cualquiera de los procedimientos de despolimerización y dimensionado descritos en el presente documento.

- 25 Los sacáridos capsulares modificados de la presente invención se pueden obtener a partir de sacáridos capsulares nativos. Sin embargo, la presente invención no se limita a sacáridos modificados obtenidos a partir de sacáridos capsulares nativos. Los sacáridos capsulares modificados de la presente invención pueden obtenerse por otros procedimientos, tales como síntesis total o parcial (véase, por ejemplo, la referencia 5).

- 30 En los sacáridos capsulares modificados de la invención, el número de unidades de monosacárido que tienen grupos de bloqueo puede variar. Preferentemente, todas o sustancialmente todas las unidades de monosacárido del sacárido capsular modificado pueden tener grupos de bloqueo. Como alternativa, al menos el 80 % o 90 % de las unidades de monosacárido del sacárido capsular modificado tienen grupos de bloqueo. Al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 unidades de monosacárido del sacárido capsular modificado pueden tener grupos de bloqueo (con la condición de que al menos el 80 % de las unidades de monosacárido tengan grupos de bloqueo).

- 40 Cuando el sacárido capsular modificado comprende al menos dos tipos de grupo de bloqueo, el número de unidades de monosacárido que tienen cada tipo de grupo de bloqueo puede variar. Por ejemplo, la proporción del número total de grupos de bloqueo constituidos por un tipo de grupo de bloqueo con relación al otro tipo o tipos de grupo de bloqueo puede variar. En particular, cuando están presentes dos tipos de grupo de bloqueo, la relación de un tipo de grupo de bloqueo con respecto al otro tipo de grupo de bloqueo puede seleccionarse de entre 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2 y 1:1. En particular, como se ha descrito anteriormente, cuando el sacárido comprende a) al menos un grupo de bloqueo en el que R¹ está sustituido con un grupo individual, siendo esta sustitución en el extremo distal de la cadena alquilo C₁₋₆; y b) al menos un grupo de bloqueo en el que R¹ está sustituido con dos grupos adyacentes, se prefiere que la relación del primer tipo de grupo de bloqueo con respecto al último tipo de grupo de bloqueo se seleccione de entre 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 91:9, 90:10, 89:11, 88:12, 87:13, 86:14, 85:15, 84:16, 83:17, 82:18, 81:19 y 80:20. De estas relaciones, se prefieren particularmente 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 91:9, 90:10, 89:11, 88:12, 87:13, 86:14 y 85:15. De estas, se prefiere 90:10.

- 50 De forma análoga, el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacárido puede variar. Por ejemplo, el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacárido puede ser de 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferentemente 1-4, más preferentemente 1 o 2, mucho más preferentemente 1.

- 55 En una realización, la al menos una unidad de monosacárido que tiene un grupo de bloqueo incluye una unidad de monosacárido no terminal. La expresión "unidad de monosacárido no terminal" se refiere a una unidad de monosacárido que no es una de las unidades de monosacárido terminales en la cadena de oligosacáridos/polisacáridos.

La presente invención incluye sacáridos capsulares modificados en los que todas las posiciones del grupo hidroxilo de las unidades de monosacárido terminales y no terminales tienen un grupo de bloqueo. Sin embargo, en algunas realizaciones preferidas, hay al menos un grupo hidroxilo libre o grupo amino en el sacárido capsular modificado de

la presente invención. Un grupo hidroxilo libre o un grupo amino es ventajoso porque proporciona un brazo para reacciones adicionales del sacárido capsular modificado, por ejemplo, para la conjugación con una molécula transportadora, como se analiza a continuación. Cuando el sacárido modificado contiene un grupo hidroxilo libre, puede ser un grupo hidroxilo anomérico particularmente un grupo hidroxilo anomérico terminal. Cuando el sacárido modificado contiene un grupo amino, puede obtenerse a partir de un grupo hidroxilo anomérico. Los grupos amino son fácilmente accesibles a partir de grupos hidroxilo anoméricos mediante aminación reductora (usando, por ejemplo, $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$). De forma similar, en otras realizaciones preferidas, hay al menos una unidad de monosacárido del sacárido capsular modificado donde dos grupos hidroxilo adyacentes del sacárido capsular nativo correspondiente no comprenden grupos de bloqueo. Preferentemente, el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o el 20 % de las unidades monosacárido tienen dos grupos hidroxilo adyacentes de esta manera. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 unidades de monosacárido tienen dos grupos hidroxilo adyacentes de esta manera. Preferentemente, entre el 5-15 %, mucho más preferentemente el 10 %, de las unidades monosacárido tienen dos grupos hidroxilo adyacentes de esta manera. Los dos grupos hidroxilo adyacentes en la unidad o unidades de monosacárido son ventajosos porque proporcionan un brazo para la conjugación con una molécula transportadora, como se analiza a continuación.

Como alternativa, al menos uno o al menos un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o el 20 % de las unidades de monosacárido del sacárido capsular modificado tienen grupos de bloqueo en los que R^1 está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 unidades de monosacárido del sacárido capsular modificado pueden tener dichos grupos de bloqueo. Preferentemente, entre el 5-15 %, mucho más preferentemente el 10 %, de las unidades de monosacárido del sacárido capsular modificado tienen grupos de bloqueo en los que R^1 está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes. Una vez más, los dos grupos hidroxilo adyacentes en la unidad o unidades de monosacárido son ventajosos porque proporcionan un brazo para la conjugación con una molécula transportadora, como se analiza a continuación.

Se ha sugerido en la referencia 4 que los grupos de bloqueo eficaces son grupos aceptores de electrones. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los enlaces glicosídicos son inestables a la hidrólisis debido a la asistencia de un ataque nucleófilo intramolecular de un grupo hidroxilo sacárido sobre el enlace glicosídico (*es decir* por la formación de un intermedio cíclico). Cuanto mayor es la nucleofilicidad del grupo hidroxilo, mayor es la tendencia al ataque nucleófilo intramolecular. Un grupo de bloqueo aceptor de electrones tiene el efecto de deslocalizar el par aislado de oxígeno, disminuyendo así la nucleofilia del oxígeno y disminuyendo la tendencia al ataque nucleófilo intramolecular. De manera sorprendente, se ha encontrado que los grupos que comprenden alquilo C_{1-6} sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidroxilo, sulfhidrilo y amina pueden ser grupos de bloqueo eficaces, a pesar de la presencia del hidroxilo nucleófilo, sulfhidrilo o amina en el grupo de bloqueo. Además, estos grupos sustituidos con hidroxilo, sulfhidrilo o amina son ventajosos, ya que permiten una conjugación más eficaz del sacárido capsular modificado con una molécula transportadora. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que este efecto surge de la hidrofiliencia relativa de grupos que comprenden alquilo C_{1-6} sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidroxilo, sulfhidrilo y amina. Además, cuando el grupo de bloqueo comprende alquilo C_{1-6} sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes, el propio grupo de bloqueo proporciona un brazo para la conjugación con una molécula transportadora.

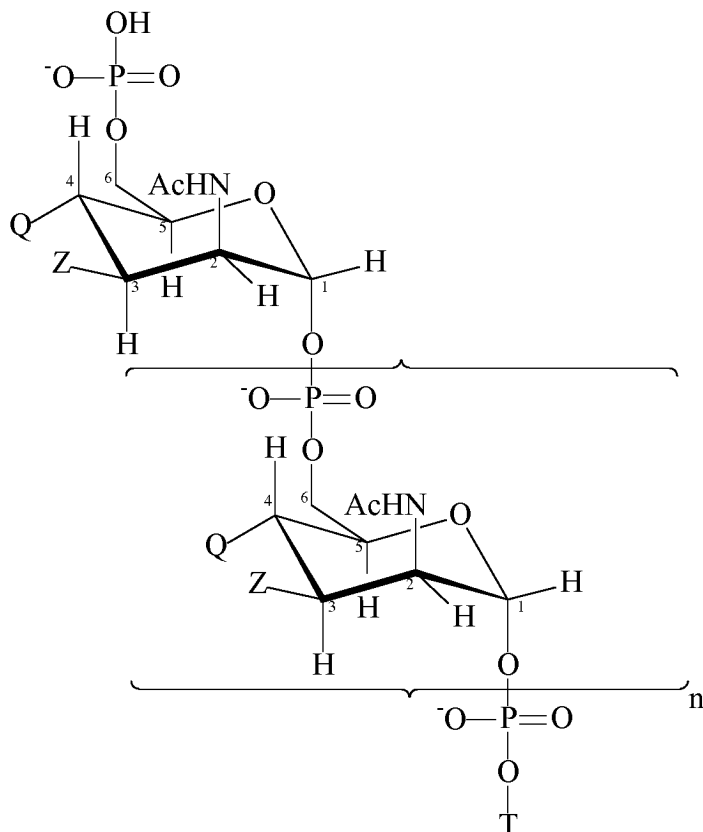
En todas las realizaciones descritas anteriormente, el sacárido capsular modificado es un sacárido capsular modificado que tiene enlaces fosfodiéster. Preferentemente, el sacárido capsular modificado es un sacárido de serogrupo A modificado de *Neisseria meningitidis*. Los sacáridos de serogrupo A de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

Cuando el sacárido capsular modificado es un sacárido de serogrupo A modificado de *Neisseria meningitidis*, el grupo de bloqueo está preferentemente en las posiciones 4 y/o 3, más preferentemente la posición 4, del sacárido de serogrupo A de *Neisseria meningitidis* correspondiente. Se ha demostrado que los grupos de bloqueo en el sacárido de serogrupo A de *Neisseria meningitidis* en las posiciones 4 y/o 3 son particularmente eficaces para mejorar la estabilidad hacia la hidrólisis.

En realizaciones con grupos de bloqueo éster (*es decir* cuando el grupo de bloqueo es de fórmula (Ia), X es C(O) e Y es R^3), los inventores han encontrado que la estabilidad de un sacárido de serogrupo A modificado de *Neisseria meningitidis* se ve afectada por la proporción de las posiciones 4 y/o 3 que tienen grupos de bloqueo. Por ejemplo, la proporción de las posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo puede ser de aproximadamente el 0 %, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o aproximadamente el 100 %, siendo preferido al menos el 30 % y aproximadamente el 100 %. De forma similar, la proporción de las posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo puede ser de aproximadamente el 0 %, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o aproximadamente el 100 %, siendo preferido al menos el 95 % y aproximadamente el 100 %. Típicamente, la proporción de las posiciones 4 y 3 que tienen grupos de bloqueo es aproximadamente la misma en cada posición. En otras palabras, la relación de las posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo con respecto a las posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo es de aproximadamente 1:1. Sin embargo, en algunas realizaciones, la proporción de las posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo puede variar con respecto a la proporción de

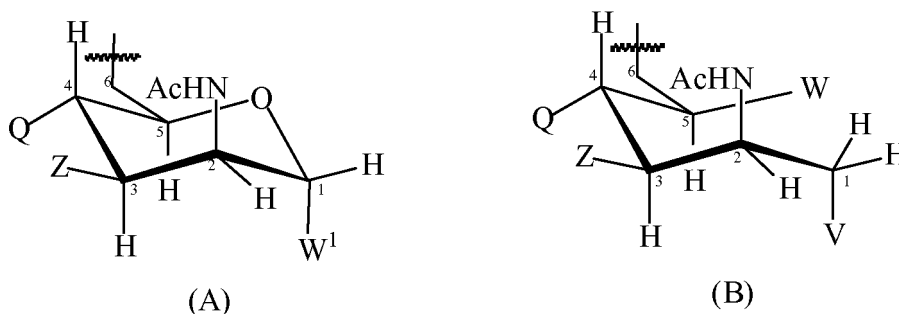
posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo. Por ejemplo, la relación de las posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo con respecto a las posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo puede ser 1:20. 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 o 1:2. De forma similar, la relación de las posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo con respecto a las posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo puede ser 1:20. 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 o 1:2.

La presente invención también proporciona un sacárido de fórmula:



en la que

T tiene la fórmula (A) o (B):



10

n es un número entero de 1 a 100;

cada grupos Z se selecciona independientemente de -OH, OAc o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente; y

15

cada grupo Q se selecciona independientemente de -OH, OAc o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente;

V se selecciona entre -NH₂, -NHE, -NE¹E², W², o -O-D, en la que: E, E¹ y E² son grupos protectores de nitrógeno, que pueden ser iguales o diferentes, y D es un grupo protector de oxígeno;

W se selecciona entre -OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente;

W¹ se selecciona entre -OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente;

W² se selecciona entre -OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente.

5 y en la que al menos uno (*por ejemplo* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40) de los grupos Z y el 80-99 % de los grupos Q son grupos de bloqueo como se ha definido anteriormente, el 1-20 % son OAc y el resto son OH.

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

Cada uno de los grupos n+2 Z pueden ser iguales o diferentes entre sí. De forma análoga, cada uno de los grupos n+2 Q pueden ser iguales o diferentes entre sí.

V es preferentemente -NH₂ o -NHE.

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

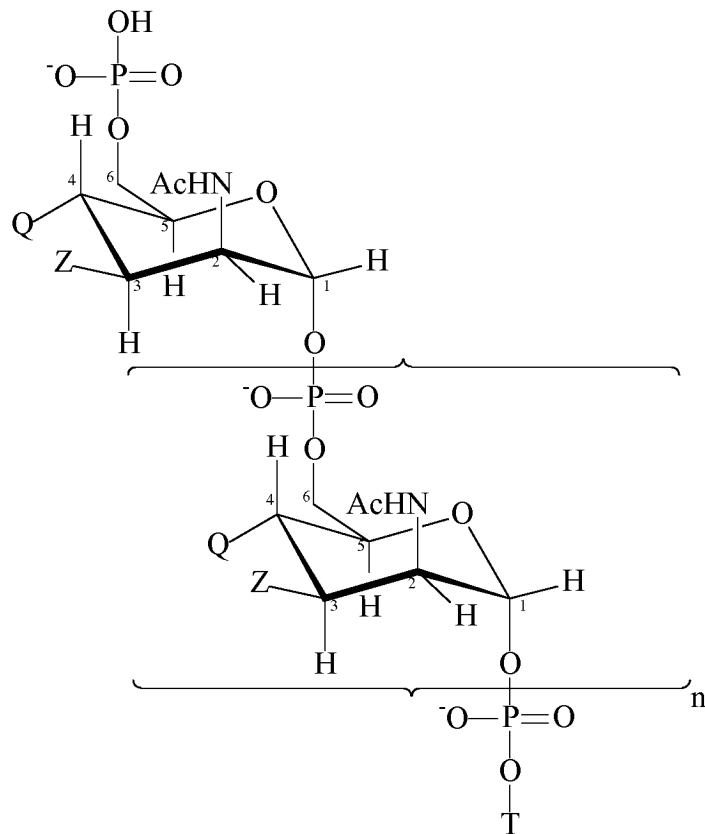
Los grupos protectores de nitrógeno divalentes, que pueden usarse como E¹E², incluyen derivados de imida cíclica (tal como N-ftalimididas, N-ditiasuccinimididas, N-2,3-difenilmaleimididas), derivados de imina (tal como N-1,1-dimetiltiometilenoaminas, N-bencilidenoaminas, N-p-metoxibencilidenoaminas, N-difenilmetilenoaminas), derivados de enamina (tal como N-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)aminas), etc.. Un grupo protector de nitrógeno divalente
20 preferido es N-ftalimidilo.

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

25 Todos los grupos Z pueden ser OH (sujeto a que al menos uno de los grupos Z sea un grupo de bloqueo). Como una alternativa a que todos los grupos Z sean OH, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o el 90 % de los grupos Z pueden ser OAc. Preferentemente, aproximadamente el 60-90 % de los grupos Z son OAc, siendo el resto de los grupos Z OH o grupos de bloqueo como se ha definido anteriormente. Preferentemente, al menos el 1
30 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o el 40 % de los grupos Z son grupos de bloqueo, el 60-90 % son OAc y el resto son OH. Preferentemente, aproximadamente el 10-40 % de los grupos Z son grupos de bloqueo, el 60-90 % son OAc y el resto son OH. Como alternativa, aproximadamente el 0 %, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o aproximadamente el 100 % de los grupos Z son grupos de bloqueo, siendo preferido al menos el 95 % y aproximadamente el 100 %.

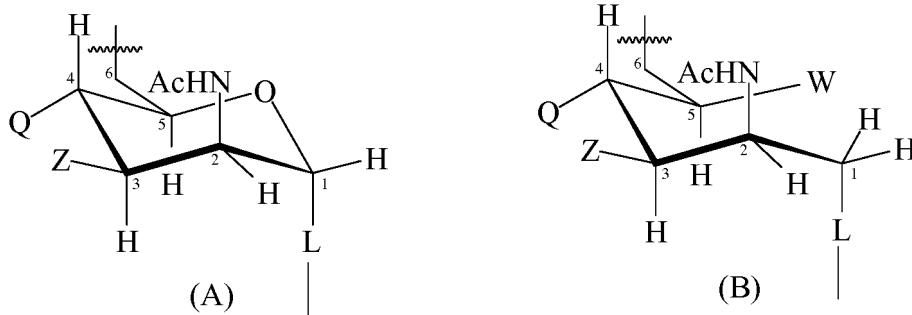
1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 % o el 20 % de los grupos Q pueden ser OAc.
35 Preferentemente, aproximadamente el 1-20 % de los grupos Q son OAc, Preferentemente, el 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de los grupos Q son grupos de bloqueo, el 1-20 % son OAc y el resto son OH. Preferentemente, aproximadamente el 80-99 % de los grupos Q son grupos de bloqueo, el 1-20 % son OAc y el resto son OH. Como alternativa, al menos el 80 %, 90 %, 95 % o aproximadamente el 100 % de los grupos Q son grupos de bloqueo, siendo preferido aproximadamente el 100 %.

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



en la que

T tiene la fórmula (A) o (B):

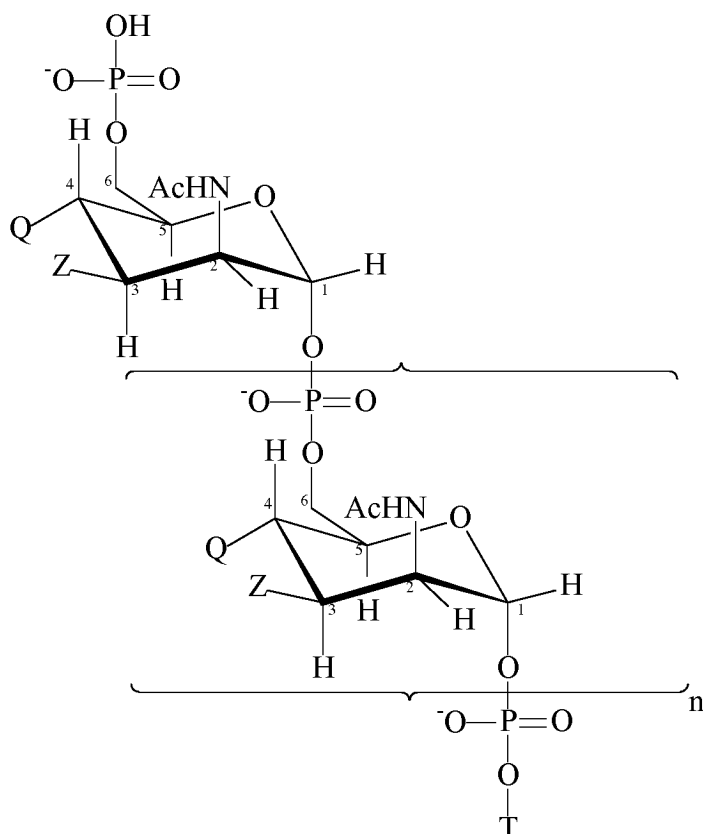


- 5 n, Z, Q y W son como se han definido anteriormente; al menos uno (*por ejemplo* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40) de los grupos Z y el 80-99 % de los grupos Q son grupos de bloqueo como se ha definido anteriormente, el 1-20 % de los grupos Q son OAc y el resto de los grupos Q son OH; y: L es O, NH, NE, S o Se.

- 10 El enlace covalente libre de L puede unirse a cualquier resto apropiado, por ejemplo, a -H, -E, un enlazador, una proteína transportadora, etc. L es preferentemente N u O. También es posible que L sea N, unido a un enlazador divalente, a un grupo protector divalente, o a un transportador proteico divalente.

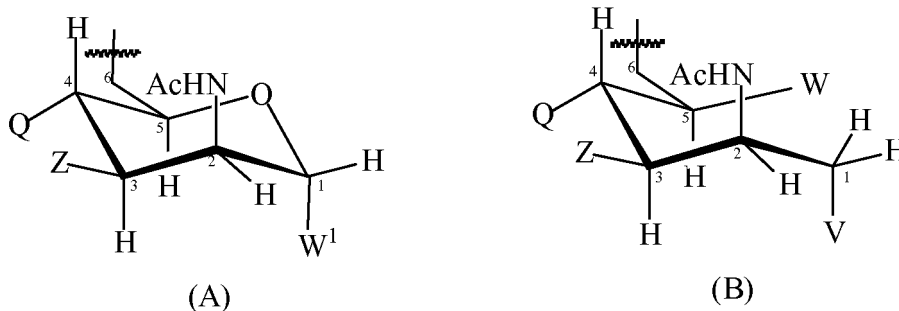
Las identidades preferidas de los grupos n, Z, Q y W se han descrito anteriormente.

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



en la que

T tiene la fórmula (A) o (B):



- 5 n, Z, Q, W, W¹ y V son como se han definido anteriormente, y al menos uno (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40) de los grupos Z y/o al menos uno (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40) de los grupos Q tienen la fórmula (IIa) o (IIb):

- 10 $-O-X-Y'$ (IIa) $-O-R^4$ (IIb)

en la que

X es como se ha definido anteriormente;

Y' es NR²R⁴;

R² es como se ha definido anteriormente; y

- 15 R⁴ es -alquileo C₁₋₄-CH(O) o -alquileo C₁₋₅-NH-, en la que el grupo -NH- es parte de un transportador proteico, y en la que al menos el 80 % de las unidades de monosacárido del sacárido tienen grupos de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1-4.

Preferentemente, el al menos uno o más grupos Z y/o Q son de fórmula (IIa). En esta realización, se prefiere que X

sea C(O).

Los grupos R² preferidos se han descrito anteriormente en relación con las fórmulas (Ia).

Los grupos R⁴ preferidos incluyen -alquileo C₁-CH(O), -alquileo C₂-CH(O), -alquileo C₃-CH(O) y -alquileo C₄-CH(O). Un grupo R⁴ particularmente preferido es -alquileo C₃-CH(O).

- 5 Otros grupos R⁴ preferidos incluyen -alquileo C₁-NH-, -alquileo C₂-NH-, -alquileo C₃-NH-, -alquileo C₄-NH- y -alquileo C₅-NH-. Un grupo R⁴ particularmente preferido es -alquileo C₄-NH-. Las identidades preferidas de los grupos n, Z, Q, W, W¹ y V se han descrito anteriormente.

Proceso para producir un sacárido modificado.

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

- 10 (a) proporcionar un sacárido capsular que tiene al menos un grupo hidroxilo en una unidad de monosacárido; y y
(b) convertir dicho al menos un grupo hidroxilo en un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente en al menos el 80 % de las unidades de monosacárido del sacárido capsular,
la etapa (b) comprende la etapa de:

(b) hacer reaccionar el sacárido capsular con [(R³C(O))₂O en presencia de un catalizador de imidazol.

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

Se describe en el presente documento un procedimiento para modificar un sacárido en el que el grupo de bloqueo es -OC(O)NR¹R² cuando la etapa (b) comprende las etapas de:

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



en la que R¹ y R² son como se han definido anteriormente.

- 25 La expresión "reactivo bifuncional" se refiere a cualquier reactivo que sea capaz de llevar a cabo las funciones duales de (i) proporcionar en la etapa (b1) un primer átomo de carbono electrófilo para acoplarse con el(los) grupo(s) hidroxilo del sacárido; y (ii) proporcionar un segundo átomo de carbono electrófilo para el acoplamiento con el grupo amino usado en la etapa (b2). En general, el segundo átomo de carbono electrófilo se regenera a partir del primer átomo de carbono electrófilo durante la etapa (b). El reactivo bifuncional proporciona una unión -C(O)- entre el polisacárido y el compuesto amino.

- 30 Los reactivos bifuncionales para su uso en la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), carbonil di-1,2,4-triazol (CDT), carbonil di-1, 2,3-benzotriazol (CDB), difenilcarbonato, bromuro de cianógeno, fosgeno o trifosgeno. El experto en la materia será consciente de otros reactivos bifuncionales que pueden realizar la misma función que estos.

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

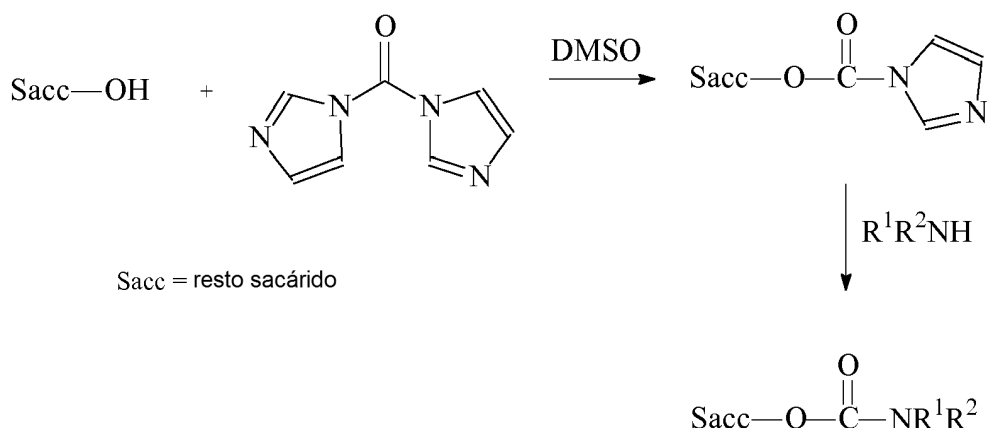
- 40 El disolvente orgánico usado en la etapa (b1) es preferentemente un disolvente aprótico. Los disolventes apróticos son bien conocidos por los expertos en la técnica y no contienen ningún átomo de hidrógeno ionizable. Estos disolventes son ventajosos porque facilitan la reacción del grupo o grupos hidroxilo en el sacárido con el reactivo bifuncional, mejorando la nucleofilicidad del grupo o los grupos hidroxilo. Los disolventes apróticos adecuados incluyen, pero sin limitación, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), formamida, hexametilfosforo triamida (HMPT), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro- 2(1H)-pirimidinona (DMPU), dimetilacetamida (DMAC), o hexametilfosforamida (HMPA). Se prefiere DMSO.

En la etapa (b2) del procedimiento descrito en el presente documento, el producto de la etapa (b1) se hace reaccionar con un compuesto amino para formar el polisacárido modificado. El compuesto amino utilizado en el procedimiento de la presente invención es de fórmula (III), como se ha definido anteriormente.

- 50 Tal como se describe en el presente documento, los compuestos amino adecuados que pueden usarse dependen de R¹ y R². Como se ha descrito anteriormente, R¹ está sustituido con un único grupo hidroxilo, siendo esta sustitución

en el extremo distal de la cadena alquilo C₁₋₆, y R² es H. Por lo tanto, los compuestos amino preferidos que pueden usarse incluyen aminometanol, 2-aminoetanol, 3-aminopropano-1-ol, 4-aminobutano-1-ol, 5-aminopentano-1-ol y 6-aminohexil-1-ol. Un compuesto amino particularmente preferido es 2-aminoetanol. Como se describe en el presente documento, R¹ está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes y R² es H. Por lo tanto, los compuestos amino preferidos que pueden usarse incluyen 1-aminoetano-1,2-diol; 1-aminopropano-1,2-diol y 3-aminopropano-1,2-diol; 1-aminobutano-1,2-diol, 1-aminobutano-2,3-diol y 4-aminobutano-1,2-diol; 1-aminopentano-1,2-diol, 1-aminopentano-2,3-diol, 5-aminopentano-2,3-diol y 5-aminopentano-1,2-diol; y 1-aminohexano-1,2-diol, 1-aminohexano-2,3-diol, 5-aminohexano-3,4-diol, 6-aminohexano-2,3-diol y 6-aminohexano-1,2-diol. Como se describe en el presente documento, R¹ está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes en el extremo distal de la cadena alquilo C₁₋₆. Por lo tanto, los compuestos amino preferidos que pueden usarse incluyen 3-aminopropano-1,2-diol, 4-aminobutano-1,2-diol, 5-aminopentano-1,2-diol y 6-aminohexano-1,2-diol. Un compuesto amino particularmente preferido es 5-aminopentano-1,2-diol. Estos pueden usarse en forma de sal (*por ejemplo* sal clorhidrato).

Un procedimiento descrito en el presente documento se ilustra en el Esquema 1 a continuación:



Esquema 1

En este esquema, el sacárido (*por ejemplo*, el polisacárido u oligosacárido MenA) se activa primero a través de al menos uno de sus grupos hidroxilo en una unidad de monosacárido usando CDI en disolvente de DMSO. El intermedio de imidazol-carbamato resultante se atrapa por la amina R¹R²NH (*por ejemplo*, 2-aminoetanol) para dar el sacárido modificado.

Como alternativa, los sacáridos modificados pueden prepararse en un procedimiento de una etapa haciendo reaccionar uno o más grupos hidroxilo en un sacárido capsular con un reactivo de fórmula XC(O)NR¹R², en el que X es un grupo saliente, y R¹ y R² son como se han definido anteriormente. Los grupos salientes adecuados incluyen, pero sin limitación, -Cl, -Br, -CF₃, -OC₆F₅ o -CCl₃.

Un procedimiento preferido para modificar un sacárido en el que el grupo de bloqueo es -OC(O)R³ es cuando la etapa (b) comprende la etapa de:

(b) hacer reaccionar el sacárido capsular con [(R³C(O))₂O en presencia de un catalizador de imidazol.

Este procedimiento es particularmente adecuado para modificar un sacárido en el que el grupo de bloqueo es -OC(O)CH₃. En esta realización, la etapa (b) comprende la etapa de:

(b) hacer reaccionar el sacárido capsular con [(CH₃C(O))₂O (anhídrido acético) en presencia de un catalizador de imidazol.

Como alternativa, los sacáridos capsulares modificados de la presente invención pueden prepararse por medios sintéticos, *por ejemplo*, a partir de unidades de monosacárido adecuadas. Típicamente, la síntesis total de un sacárido capsular modificado comprende formar enlaces glicosídicos (*por ejemplo*, enlaces fosfodiéster) entre unidades de monosacárido adecuadas y luego modificar el sacárido resultante de cualquier manera descrita anteriormente. Como alternativa, las unidades de monosacárido pueden ser modificadas antes de formar los enlaces glicosídicos para proporcionar el mismo sacárido capsular modificado.

Los sacáridos capsulares modificados de esta invención son preferentemente oligosacáridos. A partir de polisacáridos capsulares nativos, se pueden obtener oligosacáridos capsulares modificados por cualquiera de dos procedimientos: (1) modificar el polisacárido capsular seguido de despolimerización y dimensionamiento del polisacárido modificado para formar un oligosacárido modificado; o (2) despolimerizar y dimensionar el polisacárido capsular seguido por la modificación del oligosacárido resultante para formar un oligosacárido modificado. Ambos procedimientos se incluyen dentro de la presente invención. Sin embargo, el primer procedimiento se prefiere en

ciertas realizaciones, ya que este procedimiento asegura que estará disponible un grupo hidroxilo terminal para la posterior conjugación del oligosacárido modificado a una molécula transportadora, tal como una proteína.

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

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

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

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

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

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

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

Materiales de partida de sacáridos capsulares

25 Los sacáridos capsulares modificados de la invención se pueden obtener a partir de sacáridos capsulares nativos. El término "sacárido capsular nativo" se refiere a polímeros que contienen azúcar (por ejemplo, polímeros de azúcares, ácidos de azúcar, amino azúcares, alcoholes polihídricos, alcoholes de azúcar, y fosfatos de azúcar etc.) que pueden encontrarse en la cápsula de bacterias (tanto Gram-positivas como Gram-negativas) tales como *N.meningitidis*, *S.pneumoniae* y *H.influenzae*. Además, el "sacárido capsular nativo" incluye tanto polisacáridos como oligosacáridos. Los oligosacáridos capsulares nativos pueden obtenerse despolimerizando y dimensionando polisacáridos nativos.

30 La "posición del grupo hidroxilo" de un sacárido capsular nativo es una posición en el sacárido capsular nativo que tiene un grupo hidroxilo. Sin embargo, no incluye posiciones en enlaces glicosídicos, o los residuos de los mismos, que tienen grupos hidroxilo (por ejemplo, un grupo hidroxilo que es parte de un enlace de fosfato no ocupa una posición de grupo hidroxilo). Tampoco incluye posiciones donde hay un grupo de grupo acetoxi (AcO) en el sacárido capsular nativo, tampoco son posiciones de grupos hidroxilo.

El sacárido capsular nativo comprende unidades sacárido unidas por enlaces fosfodiéster. Los sacáridos que comprenden enlaces fosfodiéster pueden ser inestables a la hidrólisis.

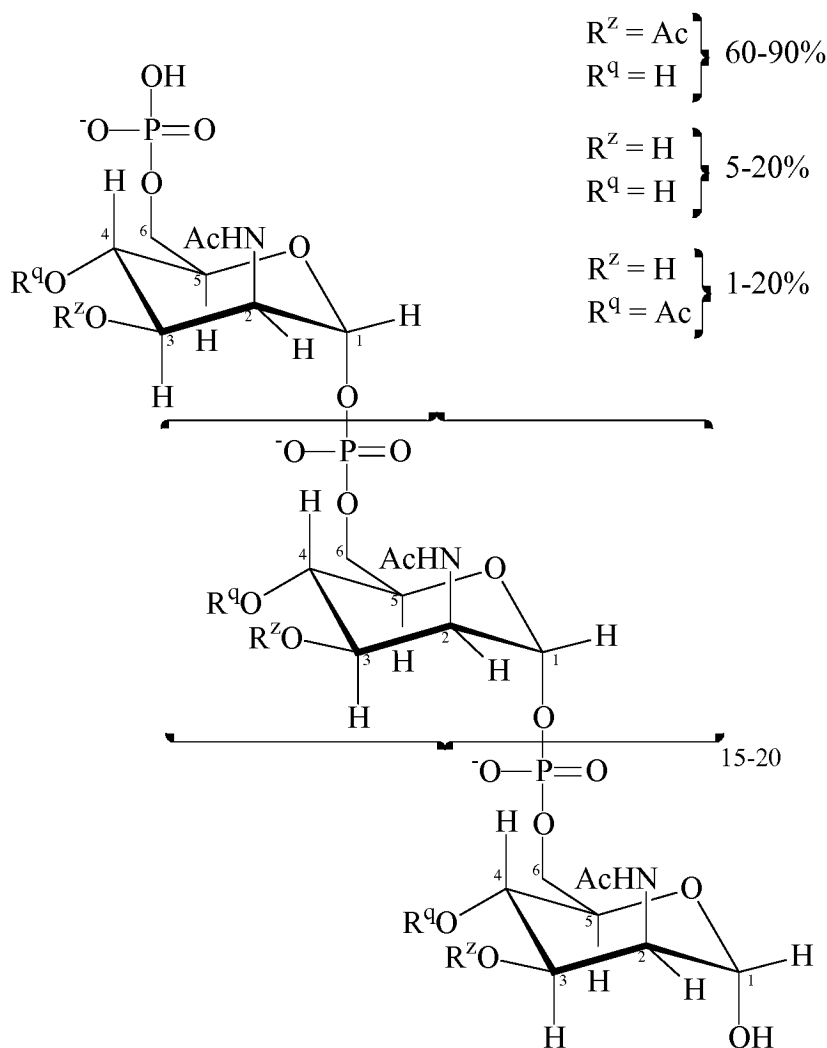
El sacárido capsular nativo y el sacárido capsular modificado de la invención son preferentemente inmunógenos en mamíferos (por ejemplo, seres humanos). El mamífero puede ser un adulto humano o un niño.

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

45 *Pseudomonas aeruginosa*.

Aunque la invención puede aplicarse a cualquier serogrupo de *N.meningitidis*, se prefiere el uso de un sacárido capsular del serogrupo A ("MenA"). El sacárido capsular MenA es particularmente inestable en solución acuosa, lo que significa que se necesitan procedimientos especiales para realizar manipulaciones químicas (por ejemplo, conjugación con proteínas transportadoras) sobre esta molécula. Sin embargo, los sacáridos MenA modificados de acuerdo con la invención resultan ventajosamente estables en solución acuosa.

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



De acuerdo con las definiciones anteriores, aproximadamente el 80-99 % de las posiciones 4 son posiciones del grupo hidroxilo, y aproximadamente el 10-40 % de las posiciones 3 son posiciones del grupo hidroxilo. El grupo 1-hidroxi terminal también ocupa una posición del grupo hidroxilo. El grupo 1-hidroxi terminal es un grupo hidroxilo anomérico terminal. El grupo hidroxilo que es parte del grupo $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})\text{O}^-$ no es una posición del grupo hidroxilo.

Conjugados sacárido-proteína

Los sacáridos modificados de la invención pueden someterse a cualquier tratamiento aguas abajo usual que se aplique a sacáridos (*por ejemplo* derivatización, conjugación, fragmentación, etc.). Para aumentar la inmunogenicidad, los sacáridos modificados de la invención se conjugan preferentemente con una proteína transportadora. La conjugación con proteínas transportadoras es particularmente útil para vacunas pediátricas [6] y es una técnica bien conocida [*por ejemplo* revisado en las ref. 7 a 15 etc.]. El polisacárido puede estar unido directamente a la proteína [2, 16] o puede unirse a través de un grupo enlazador. Se han propuesto muchos tipos diferentes de grupos enlazadores para unir polisacáridos a proteínas [*por ejemplo* 3, 17].

Por lo tanto, la invención proporciona un conjugado de una proteína y un sacárido modificado de la invención. La proteína puede conjugarse directamente con el sacárido, o puede usarse un enlazador. Se puede usar cualquier química de enlazador adecuada. La estabilidad mejorada del polisacárido modificado permite usar ventajosamente una amplia gama de enlaces.

Como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones se prefiere que el sacárido capsular modificado tenga al menos un grupo hidroxilo libre o grupo amino que puede usarse como un brazo para la posterior unión a una proteína transportadora.

Se puede obtener un sacárido capsular modificado que tiene un grupo hidroxilo libre bloqueando selectivamente grupos hidroxilo en un sacárido capsular, o desbloqueando selectivamente un sacárido capsular modificado en el que se bloquean todos los grupos hidroxilo. Como alternativa, se puede revelar un grupo hidroxilo libre mediante la despolimerización y el dimensionado de un sacárido capsular modificado. Preferentemente, el al menos un grupo

hidroxilo libre es un grupo hidroxilo anomérico terminal. Se prefiere el grupo hidroxilo anomérico terminal como el grupo hidroxilo libre porque un grupo hidroxilo anomérico terminal puede revelarse por despolimerización y dimensionamiento de un sacárido capsular modificado.

5 Se puede obtener un sacárido capsular modificado que tiene un grupo amino libre mediante aminación reductora de un grupo hidroxilo anomérico terminal, opcionalmente seguido de protección del grupo -NH₂ resultante. La reacción de aminación reductora puede llevarse a cabo antes o después de la etapa de modificación de la presente invención. Preferentemente, la aminación reductora se lleva a cabo antes de la etapa de modificación de la presente invención puesto que el grupo -NH₂ resultante puede protegerse/desprotegerse selectivamente en presencia de grupos hidroxilo/grupos de bloqueo.

10 Por ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un conjugado sacárido-proteína que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sacárido capsular modificado de la invención, en el que el sacárido modificado comprende un grupo hidroxilo anomérico terminal o un grupo amino derivado de un grupo hidroxilo anomérico terminal; y

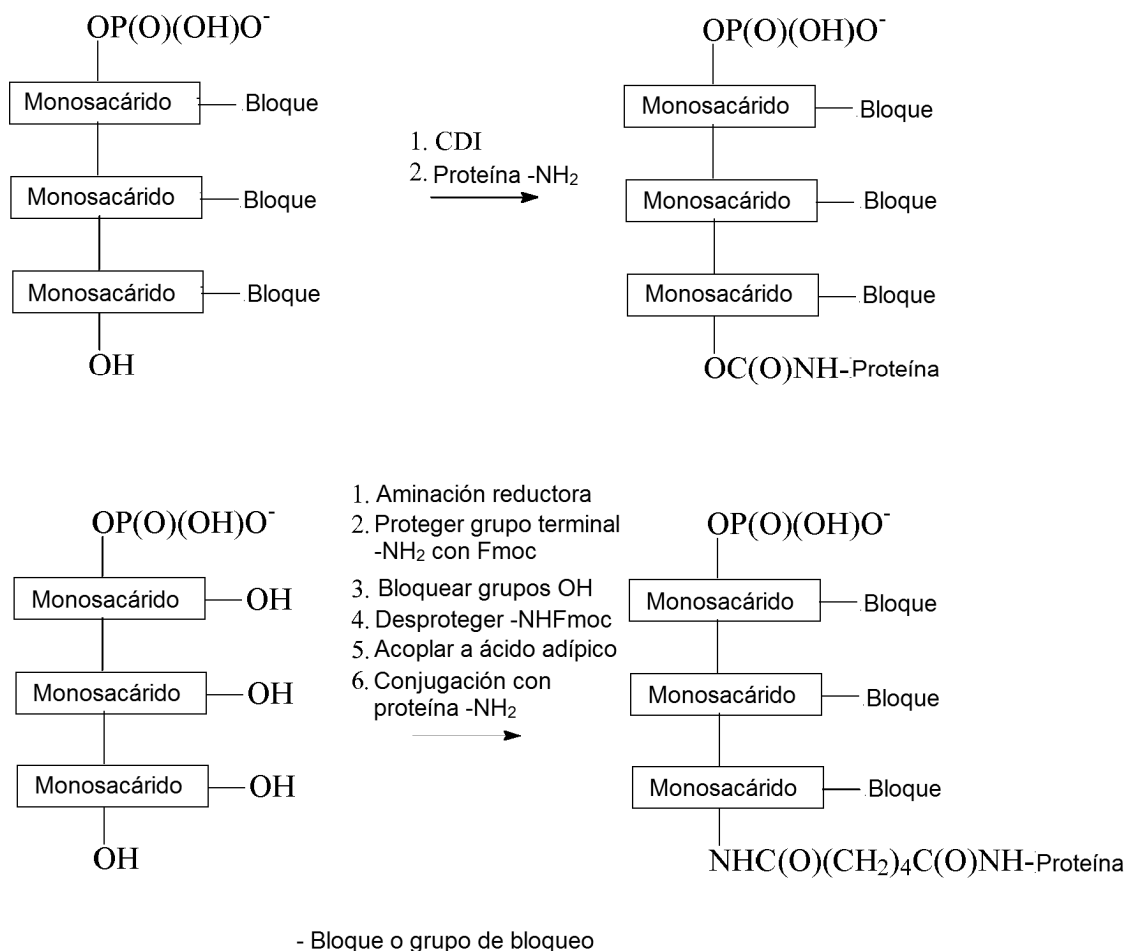
15 (b) unir el sacárido capsular modificado a una proteína a través del grupo hidroxilo anomérico terminal o el grupo amino derivado de un grupo hidroxilo anomérico terminal.

La proteína es preferentemente una toxina o toxoide bacteriano, en particular una toxina o toxoide de difteria. Por ejemplo, la proteína es preferentemente CRM₁₉₇.

20 Los enlaces a través de un grupo enlazador pueden realizarse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 3 y 17. Un tipo preferido de enlace es un enlazador carbonilo, que puede formarse por reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido modificado con CDI [18, 19] seguido de reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otro tipo preferido de unión es un enlazador de ácido adípico, que puede formarse acoplando un grupo -NH₂ libre en el sacárido modificado con ácido adípico (usando, por ejemplo, activación de diimida), y a continuación acoplado a una proteína al intermedio sacárido-ácido adípico resultante. [11, 20, 21]. Otros enlazadores incluyen B-propionamido [22], nitrofenil-etilamina [23], haluros de haloacilo [24], enlaces glicosídicos [25], ácido 6-aminocaproico [26], ADH [27], restos de C₄ a C₁₂ [28] *etc.*

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

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



Esquema 2

Las uniones directas a la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido seguido de aminación reductora con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias 2 y 16. Por ejemplo, en las realizaciones en las que hay al menos una unidad de monosacárido del sacárido capsular modificado donde dos grupos hidroxilo adyacentes del sacárido capsular nativo correspondiente no comprenden grupos de bloqueo, uno o más pares de grupos hidroxilo adyacentes pueden convertirse en grupos aldehído por escisión oxidativa (*por ejemplo* NaIO₄, Pb(OAc)₄, etc.). El sacárido capsular modificado puede unirse entonces a la proteína mediante aminación reductora.

Por ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un conjugado sacárido-proteína que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un sacárido capsular modificado de la invención en el que hay al menos una unidad de monosacárido del sacárido capsular modificado donde dos grupos hidroxilo adyacentes del sacárido capsular nativo correspondiente no comprenden grupos de bloqueo;
- (b) convertir al menos uno de los pares de grupos hidroxilo adyacentes en grupos aldehído por escisión oxidativa; y
- 15 (c) unir el sacárido capsular modificado a una proteína por aminación reductora.

La proteína es preferentemente una toxina o toxoide bacteriano, en particular una toxina o toxoide de difteria. Por ejemplo, la proteína es preferentemente CRM₁₉₇.

- 20 Como se ha descrito anteriormente, al menos una de las unidades de monosacárido del sacárido capsular modificado comprenden grupos de bloqueo en los que R¹ está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes. Los dos grupos hidroxilo adyacentes pueden usarse como un brazo para la posterior unión a una proteína transportadora. Por ejemplo, uno o más pares de grupos hidroxilo adyacentes pueden convertirse en grupos aldehído por escisión oxidativa (*por ejemplo*, NaIO₄ Pb(OAc)₄, etc.). El sacárido capsular modificado puede unirse

entonces a la proteína mediante aminación reductora.

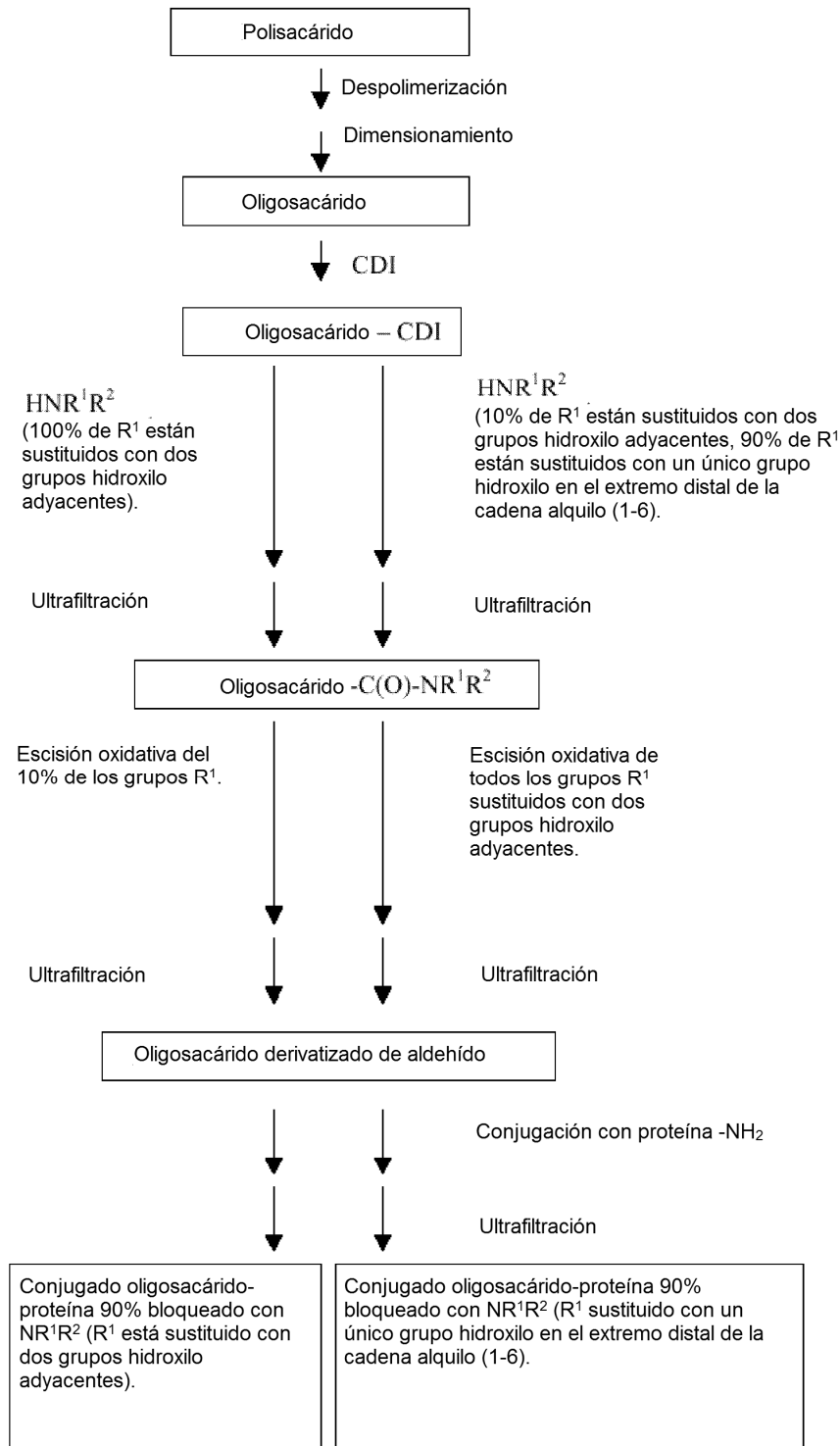
Por ejemplo, se describe en el presente documento un procedimiento para preparar un conjugado sacárido-proteína que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar un sacárido capsular modificado de la invención en el que al menos una de las unidades de monosacárido comprenden bloques de bloqueo en los que R¹ está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes;
- (b) convertir al menos uno de los pares de grupos hidroxilo adyacentes en grupos aldehído por escisión oxidativa; y
- (c) unir el sacárido capsular modificado a una proteína por aminación reductora.

- 10 La proteína es preferentemente una toxina o toxoide bacteriano, en particular una toxina o toxoide de difteria. Por ejemplo, la proteína es preferentemente CRM₁₉₇.

Tal como se describe en el presente documento, todos los grupos hidroxilo adyacentes presentes en los grupos de bloqueo se convierten en grupos aldehído en la etapa (b). En algunas realizaciones, el número de grupos aldehídos producidos depende del número total de grupos de bloqueo en los que R¹ está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes que están presentes en el sacárido capsular modificado. En otras realizaciones, las condiciones para la escisión oxidativa se seleccionan de tal forma que solo una proporción de los grupos hidroxilo adyacentes presentes en los grupos de bloqueo se convierten en grupos aldehído. En algunas realizaciones, el número de grupos aldehídos producidos depende del número total de grupos de bloqueo en los que R¹ está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes que están presentes en el sacárido capsular modificado y las condiciones seleccionadas. En dichas realizaciones, se prefiere que el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o el 20 % de las unidades de monosacárido del sacárido capsular modificado tengan grupos de bloqueo que se conviertan en los grupos aldehído. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 unidades de monosacárido tienen grupos de bloqueo que se convierten en grupos aldehído. Preferentemente, entre el 5-15 %, mucho más preferentemente el 10 %, de las unidades de monosacárido tienen grupos de bloqueo que se convierten en grupos aldehído.

El Esquema 3 muestra dos ejemplos adicionales de cómo un sacárido capsular puede conjugarse a una proteína transportadora, tal como se describe en el presente documento. En el primer ejemplo (a la izquierda), todos los grupos de bloqueo tienen grupo R¹ que está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes. Una proporción (por ejemplo, 10 %) de estos grupos hidroxilo adyacentes se convierte en grupos aldehído para su conjugación con una proteína. En el segundo ejemplo (a la derecha), están presentes dos tipos de grupo de bloqueo. Una proporción de estos (*por ejemplo* 10 %) tienen un R¹ que está sustituido con dos grupos hidroxilo adyacentes. Todos estos grupos hidroxilo adyacentes se convierten en grupos aldehído para su conjugación con una proteína.



Esquema 3

5 Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoides de difteria o tétanos. Estos son comúnmente utilizados en las vacunas conjugadas. Se prefiere particularmente el toxoide de difteria CRM₁₉₇ [29]. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana externa de *N.meningitidis* [30], péptidos sintéticos [31,32], proteínas de choque térmico [33, 34], proteínas de la tos ferina [35,36], proteína D de *H.influenzae* [37], citocinas [38], linfocinas [38], hormonas [38], factores de crecimiento [38], toxina A o B de *C.difficile* [39], proteínas captadoras de hierro [40] etc. Es posible usar mezclas de proteínas transportadoras.

Después de la conjugación, pueden separarse sacáridos libres y conjugados. Existen muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, *etc.* [véanse también las ref. 41, 42 *etc.*].

Una proteína transportadora individual puede llevar múltiples sacáridos diferentes [43].

5 **Composiciones y procedimientos farmacéuticos**

Las composiciones hechas usando los procedimientos de la invención son farmacéuticamente aceptables. Pueden incluir componentes además del sacárido modificado y/o conjugado, *por ejemplo*, incluirán típicamente uno o más vehículos farmacéuticos. Una discusión exhaustiva de dichos componentes se encuentra disponible en la referencia 44. Por lo tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un sacárido modificado de la invención y/o un conjugado de la invención, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición es preferentemente una composición inmunógena (por ejemplo, una vacuna). Las vacunas basadas en sacáridos o conjugados sacárido-proteína se conocen bien en la técnica.

Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina; o un tampón citrato. Los tampones típicamente se incluirán en el intervalo 5-20 mM.

Para controlar la tonicidad, se prefiere que incluyan una sal fisiológica, tal como una sal sódica. Se prefiere cloruro sódico (NaCl), que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrogenofosfato potásico, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, *etc.*

Las composiciones tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y preferentemente se encontrarán dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg. Se ha notificado previamente que la osmolalidad no tiene un impacto en el dolor causado por la vacunación [45], pero se mantiene preferentemente la osmolalidad en este intervalo.

El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,0, y más típicamente entre 5,5 y 6,5, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5. Un procedimiento de la invención puede incluir por lo tanto una etapa de ajuste del pH de la vacuna en bruto antes de su envasado.

La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirógena, por ejemplo, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis. La composición es preferentemente sin gluten.

La composición puede incluir un conservante tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna esté sustancialmente libre de (*es decir* menos de 5 µg/ml) material de mercurio, por ejemplo, libre de tiomersal. Las vacunas que no contienen mercurio son las más preferidas.

La composición puede incluir material para una única inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (*es decir* un "kit multidosis"). Se prefiere la inclusión de un conservante en las disposiciones multidosis.

Las vacunas se administran típicamente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml.

Las composiciones se almacenan preferentemente entre 2 °C y 8 °C. No deben congelarse. Idealmente deben mantenerse alejadas de la luz directa.

Cuando una composición incluye un conjugado, también puede comprender una proteína transportadora no conjugada, pero se prefiere que la cantidad de vehículo no conjugado con respecto a la cantidad total de ese vehículo sea inferior al 5 %.

Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración a pacientes humanos, y la invención proporciona composiciones de la invención para su uso en un procedimiento para aumentar una respuesta inmune en un paciente, que comprende la etapa de administrar dicha composición al paciente. La invención también proporciona las composiciones de la invención para su uso como medicamentos. La invención también proporciona el uso de un sacárido modificado y/o de un conjugado de la invención, en la fabricación de un medicamento para aumentar una respuesta inmune en un paciente. La respuesta inmunitaria suscitada por estos usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectores contra la infección meningocócica. Las enfermedades causadas por *Neisseria* incluyen meningitis, septicemia y gonorrea. Se prefiere la prevención y/o el tratamiento de la meningitis bacteriana.

Las composiciones se pueden administrar de diversas maneras. La ruta de inmunización más preferida es por inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o la pierna), pero otras rutas disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [46-48], oral [49], intradérmica [50,51], transcutánea, transdérmica [52], *etc.*

Las composiciones preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. El paciente puede tener menos de 1 año de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. El paciente puede ser anciano (*por ejemplo* ≥ 50 años de edad, preferentemente ≥ 65 años), joven (*por ejemplo* ≤ 5 años), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, personal militar y de las fuerzas armadas, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeprimidos, personas que han viajado al extranjero. Estas composiciones no son únicamente adecuadas para estos grupos, sin embargo, y pueden usarse de manera más general en una población.

El tratamiento puede ser una pauta de una sola dosis o una pauta de múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por la misma o por diferentes rutas, *por ejemplo*, un cebado parenteral y un refuerzo mucosal, un cebado mucosal y un refuerzo parenteral, *etc.* La administración de más de una dosis (típicamente dos dosis) es particularmente útil en los pacientes inmunológicamente no expuestos previamente. Se aplicarán múltiples dosis separadas por al menos 1 semana (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, *etc.*).

Las composiciones de la invención pueden administrarse a pacientes en sustancialmente el mismo tiempo que (*por ejemplo* durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud) otras composiciones, y en particular al mismo tiempo que otras vacunas.

Las composiciones inmunógenas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno de sacárido, así como cualquier otro de otros componentes especificados, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una única dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (*por ejemplo* primate no humano, primate, *etc.*), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico tratante de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos de rutina. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo).

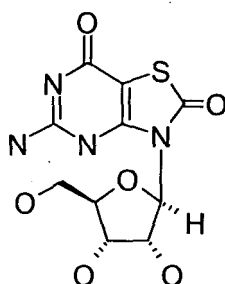
Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (*es decir* para prevenir la infección) o terapéuticas (*es decir*, para tratar la enfermedad después de la infección), pero normalmente serán profilácticas.

Adyuvantes

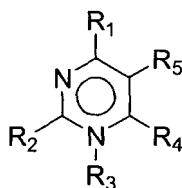
Las composiciones de la invención pueden incluir ventajosamente un adyuvante, que pueden funcionar para potenciar las respuestas inmunitarias suscitadas en un paciente que recibe la composición. Los adyuvantes que se pueden usar con la invención incluyen, pero sin limitación:

- Una composición que contiene mineral, incluyendo sales de calcio y sales de aluminio (o mezclas de las mismas). Las sales de calcio incluyen fosfato cálcico (por ejemplo, las partículas "CAP" desveladas en la referencia 53). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, *etc.*, adoptando las sales cualquier forma adecuada (*por ejemplo* gel, cristalina, amorfa, *etc.*). Se prefiere la adsorción a estas sales. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse en forma de una partícula de una sal metálica [54]. Los adyuvantes de sales de aluminio se describen en más detalle más adelante.
- Una emulsión de aceite en agua, como se describe con más detalle a continuación.
- Un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como uno que contiene un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina), un motivo TpG [55], un ARN bicatenario, un oligonucleótido que contiene una secuencia palíndroma, o un oligonucleótido que contiene una secuencia poli(dG). Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos, tales como modificaciones fosforotioato y pueden ser bicatenarios o (excepto para el ARN) monocatenarios. Las referencias 56 a 58 desvelan posibles sustituciones análogas, *por ejemplo*, el reemplazo de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se discute adicionalmente en las ref. 59-64. Una secuencia CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [65]. La secuencia CpG pueden ser específica para una respuesta inmune de Th1, tal como un ODN (oligodesoxinucleótido) CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta a linfocitos B, tal como un ODN CpG-B. los ODN CpG-A y CpG-B se analizan en las ref. 66-68. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A. Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótido CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, las referencias 65 y 69-71. Un adyuvante CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenderán típicamente al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

- 5 • monofosforil lípido A 3-O-desacilado ("3dMPL", también conocido como "MPL™") [72-75]. 3dMPL se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A pero carece de un grupo fosforilo inestable a ácido y un grupo acilo inestable a base. La preparación de 3dMPL se describió originalmente en la referencia 76. 3dMPL puede tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, variando por su acilación (por ejemplo, teniendo 3, 4, 5 o 6 cadenas acilo, que pueden ser de diferentes longitudes). Los dos monosacáridos de glucosamina (también conocido como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-acilados en sus carbonos de la posición 2 (*es decir*, en las posiciones 2 y 2'), y también hay O-acilación en la posición 3'.
- 10 • Un compuesto de imidazoquinolina, tal como Imiquimod ("R-837") [77,78], Resiquimod ("R-848") [79], y sus análogos; y sales del mismo (*por ejemplo* las sales clorhidratos). Pueden encontrarse más detalles sobre imidazoquinolinas inmunoestimuladoras en las referencias 80 a 84.
- 15 • Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los desvelados en la referencia 85. Los procedimientos de formulación, fabricación y cribado para compuestos activos también se describen en la referencia 85. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tal como TNF- α .
- 20 • Un compuesto de triptantrina, tal como los desvelados en la referencia 86. Los procedimientos de formulación, fabricación y cribado para compuestos activos también se describen en la referencia 86. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tal como TNF- α .
- Un análogo nucleosídico, tales como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):

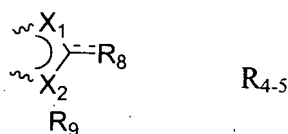


y profármacos del mismo; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en las referencias 87 a 89; (f) un compuesto que tiene la fórmula:



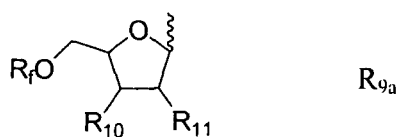
25 en la que:

- 30 cada uno de R₁ y R₂ es independientemente H, halo, -NR_aR_b, -OH, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, heterociclilo, "heterociclilo sustituido", arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, alquilo C₁₋₆, o alquilo C₁₋₆ sustituido;
- R₃ está ausente, H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;
- cada uno de R₄ y R₅ es independientemente H, halo, heterociclilo, "heterociclilo sustituido", -C(O)-R_d, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, o unidos juntos para formar un anillo de 5 miembros como en R₄₋₅:



consiguiéndose la unión en los enlaces indicados por ~~~

- 35 cada uno de X₁ y X₂ es independientemente N, C, O o S;
- R₈ es H, halo, -OH, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, -OH, -NR_aR_b, -(CH₂)_n-O-R_c, -O-(alquilo C₁₋₆), -S(O)_pR_a, o -C(O)-R_d;
- R₉ es H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R_{9a}, en la que R_{9a} es:



consiguiéndose la unión en el enlace indicado por ~~~~
 cada uno de R₁₀ y R₁₁ es independientemente H, halo, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NR_aR_b, o -OH;

5 cada R_a y R_b es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, arilo C₆₋₁₀;
 cada R_c es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C₁₋₆, o alquilo C₁₋₆ sustituido;
 cada R_d es independientemente H, halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆), -NH(alquilo C₁₋₆ sustituido), -N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆ sustituido)₂, arilo C₆₋₁₀, o heterociclilo;

10 cada R_e es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;

cada R_f es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, fosfato, difosfato, o trifosfato;

cada n es independientemente 0, 1, 2, o 3;

cada p es independientemente 0, 1 o 2; o

15 o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

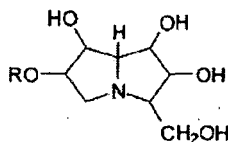
- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [90].
- Compuestos desvelados en la referencia 91, incluyendo: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoleidona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobenzoimidazol quinolinona (ABIQ) [92,93], compuestos de hidrafthalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de quinazolinona, compuestos de pirrol [94], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina, y compuestos de benzazol [95].
- Compuestos desvelados en la referencia 96, incluyendo 3,4-di(1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-dionas, análogos de estaurosporina, piridazinas derivatizadas, cromen-4-onas, indolinonas, quinazolinonas, y análogos nucleosídicos.
- 25 • Un derivado de fosfato de aminoalquilo glucosaminida, tal como RC-529 [97,98].
- Un fosfazeno, tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfazeno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 99 y 100.
- Inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIP), tales como:

30 N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2-butil-
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2-butil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-
 35 diamina 1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol
 acetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etilo 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-
 40 imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina 1-{4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-
 imidazo[4,5-c]quinolin-1-il}-2-metilpropan-2-ol 1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-
 metilpropan-2-ol N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina.

45 Saponinas [capítulo 22 de la ref. 131], que son un grupo heterólogo de glicósidos de esterol y glicósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies de plantas. Las saponinas de la corteza del árbol quillay *Quillaia saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como adyuvantes. Las saponinas también pueden obtenerse en el mercado a partir de *Smilax ornata* (sarsapilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officinalis* (saponaria). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tal como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™. Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina

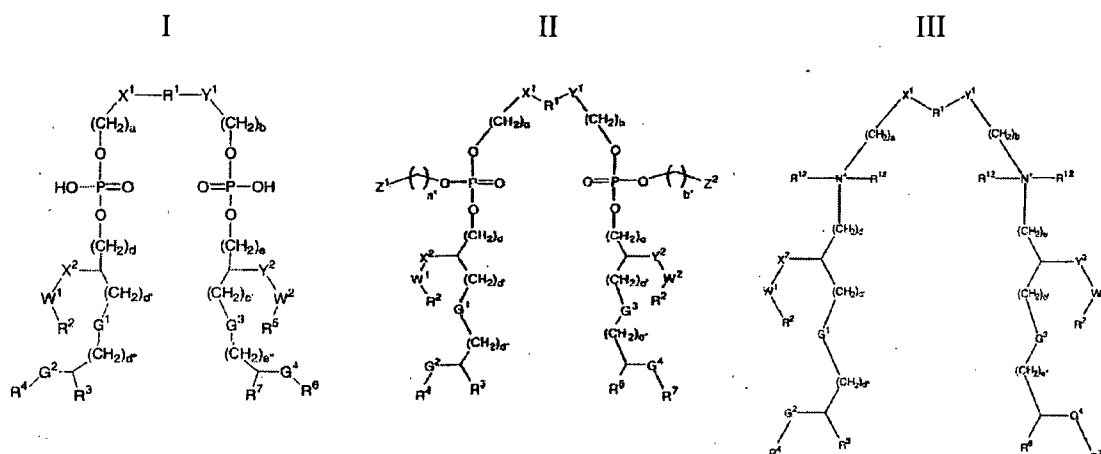
es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la ref. 101. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol [102]. Las combinaciones de saponinas y colesteroles pueden utilizarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 131]. Los ISCOM también incluyen típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede ser usada en ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las ref. 102-104. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [105]. Puede encontrarse una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina en las ref. 106 y 107.

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
- Toxinas de ribosilación de ADP bacterianas (*por ejemplo* la enterotoxina inestable al calor *E.coli* "LT", toxina del cólera "CT", o toxina de pertussis "PT") y derivados detoxificados de las mismas, tales como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 [108]. El uso de toxinas de ribosilación de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 109 y como adyuvantes parenterales en la ref. 110.
 - Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificado [111] o quitosano y sus derivados [112].
 - Las micropartículas (*es decir* una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 µm de diámetro, o de ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(ácido α-hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), prefiriéndose poli(lactida-co-glicolida), tratada opcionalmente para que tenga una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).
 - Liposomas (capítulos 13 y 14 de la ref. 131). Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para su uso como adyuvantes se describen en las ref. 113-115.
 - Éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [116]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol [117] así como tensioactivos de éteres o éster de polioxietileno alquilo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional, tal como octoxinol [118]. Los éteres de polioxietileno se seleccionan entre el siguiente grupo: éter de polioxietileno-9-laurilo (lauril éter 9), polioxietileno-9-esteoril éter, polioxietileno-8-esteoril éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter, y polioxietileno-23-lauril éter.
 - Péptidos de muramilo, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-A1-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida ("DTP-DPP", o "Theramida™"), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").
 - Una preparación de proteosomas proteicos de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram negativa en combinación con una preparación de liposacárido (LPS) derivada de una segunda bacteria Gram negativa, en la que el proteosoma proteico de membrana externa y las preparaciones de LPS forman un complejo coadyuvante no covalente estable. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo compuesto por la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y LPS.
 - Metil inosina 5'-monofosfato ("MIMP") [119].
 - Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilada [120], tal como uno que tiene la fórmula:

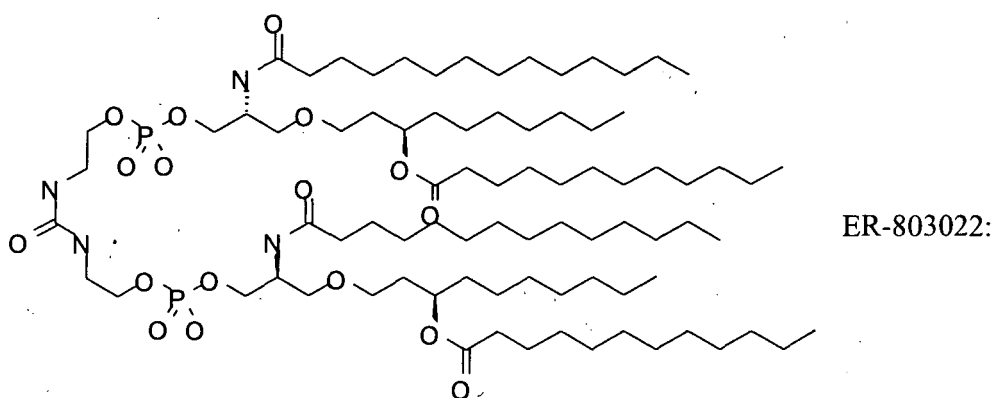
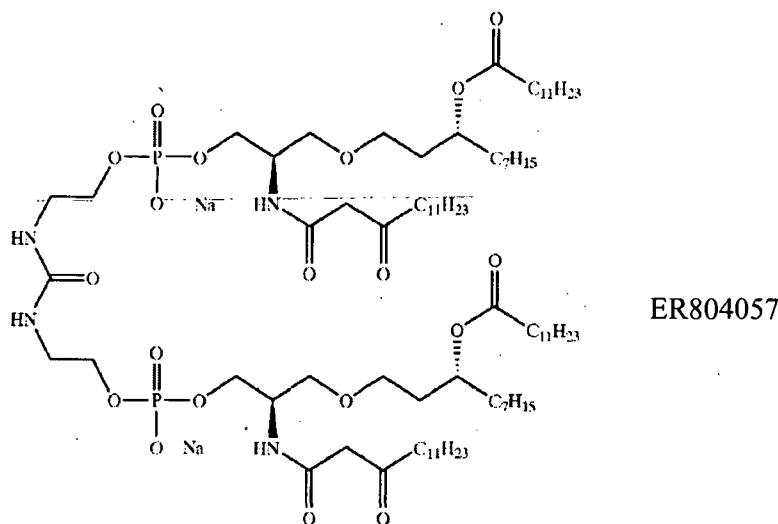


donde R se selecciona entre el grupo que comprende hidrógeno, grupos lineales o ramificados, sin sustituir o sustituidos, saturados o insaturados acilo, alquilo (*por ejemplo* cicloalquilo), alqueno, alquino y arilo, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: casuarina, casuarina-6-α-D-glucopiranos, 3-epi-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc.

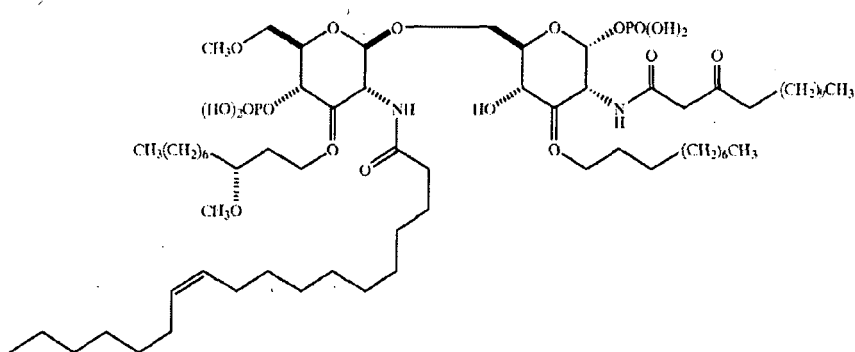
- Una gamma inulina [121] o derivado de la misma, tal como algamulina.
- Un compuesto de fórmula I, II o III, o una sal del mismo:



como se define en la referencia 122, tal como "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", "ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", ER 803022 o "ER 804057", por ejemplo:



- 5
- Derivados de lípido A de *Escherichia coli* tal como OM-174 (descritos en las ref. 123 y 124).
 - Una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (normalmente neutro), tal como aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanaminio bromuro-difitanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") o aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanaminio bromuro-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren las formulaciones que contienen sales (±)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradecenoiloxi)-1-propanaminio [125].
- 10
- Compuestos que contienen lípidos unidos a una cadena principal acíclica que contiene fosfato, tal como el antagonista TLR4 E5564 [126,127]:



Estos y otros adyuvantes-sustancias activas se analizan con más detalle en las referencias 131 y 132.

Las composiciones pueden incluir dos o más de dichos adyuvantes.

Los antígenos y adyuvantes en una composición estarán típicamente en mezcla.

5 Adyuvantes de emulsión de aceite en agua

Las emulsiones de aceite en agua son particularmente útiles como coadyuvantes. Se conocen varias emulsiones de este tipo, que típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el uno o más aceites y tensioactivos biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión son generalmente de menos de 5 μm de diámetro, e incluso pueden tener un diámetro submicrométrico, siendo estos pequeños tamaños obtenidos con un microfluidificador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotitas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

La invención se puede usar con aceites tales como los de una fuente animal (tal como el pescado) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, que son los más comúnmente disponibles, ilustran los aceites de nueces. Puede usarse aceite de yoyoba, *por ejemplo*, obtenido de la alubia de la yoyoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semillas de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también se puede usar el aceite de otros cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no aparecen naturalmente en los aceites de semillas, pueden prepararse mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados partiendo de los aceites de nueces y semillas. Las grasas y aceites de leche de mamífero son metabolizables y por lo tanto pueden usarse en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena, tal como el esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de peces que pueden usarse en el presente documento. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos, y se citan generalmente como terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene terpenoides ramificados e insaturados conocidos como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que se prefiere particularmente en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, es también un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluyendo escualano y escualeno, están fácilmente disponibles a través de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Pueden usarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse según su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos de la invención preferidos tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15, y más preferentemente al menos 16. La invención puede usarse con tensioactivos incluyendo, pero sin limitación: los tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitán (normalmente citados como Tween), especialmente el polisorbato 20 y el polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/o óxido de butileno (BO), comercializado con el nombre comercial DOWFAX™, tal como copolímero de bloque de EO/PO lineal; octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos etoxi de repetición (oxi-1,2-etanodililo), siendo octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tal como fosfatidilcolina (lecitina); ésteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílicos, cetílicos, estearílicos y oleílicos (conocidos como tensioactivos Brij), tal como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como los SPAN), tal como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100. Pueden usarse mezclas de tensioactivos, *por ejemplo*, mezclas Tween 80/Span 85.

Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero sin limitación:

- 5 • Una emulsión submicrónica de escualeno, Tween 80, y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente el 5 % de escualeno, aproximadamente el 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas proporciones se convierten en le 4,3 % de escualeno, el 0,5 % de polisorbato 80 y el 0,48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como "MF59" [128-130], como se describe con más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 131 y el capítulo 12 de la ref. 132. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, *por ejemplo*, tampón citrato sódico 10 mM.
- 10 • Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y Tween 80. La emulsión puede incluir una solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (*por ejemplo* al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de tocoferol y del 0,3 al 3 % de Tween 80, y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤ 1 , ya que proporciona una emulsión más estable. Una emulsión de este tipo se puede preparar disolviendo Tween 80 en PBS para dar una solución al 2 %, mezclando después 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), y después microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrónicas, *por ejemplo* con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm.
- 15 • Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (*por ejemplo*, Triton X-100).
- 20 • Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de suministro útil para dipéptidos de muramilo y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [133] (0,05-1 % de Thr-MDP, 5 % de escualano, 2,5 % de Pluronic L121 y 0,2 % de Polisorbato 80). También puede usarse sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [134] (5 % de escualano, 1,25 % de Pluronic L121 y 0,2 % de Polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.
- 25 • Una emulsión que tiene del 0,5-50 % de un aceite, el 0,1-10 % de un fosfolípido, y el 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Tal como se describe en la referencia 135, los componentes fosfolipídicos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de gota submicrométricos son ventajosos.
- 30 • Una emulsión submicrónica de aceite en agua de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Pueden incluirse aditivos tales como QuilA saponina, colesterol, un conjugado saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 136, producido por adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil) propanodiamina.
- 35 • Una emulsión en la que una saponina (*por ejemplo* QuilA o QS21) y un esteroles (*por ejemplo* un colesterol) se asocian como micelas helicoidales [137].

Las emulsiones pueden mezclarse extemporáneamente con el antígeno, en el momento de la administración. Por lo tanto, el adyuvante y el antígeno pueden mantenerse por separado en una vacuna envasada o distribuida, lista para la formulación final en el momento de su uso. El antígeno estará generalmente en una forma acuosa, de manera que la vacuna se prepara finalmente mezclando dos líquidos. La relación en volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (*por ejemplo* entre 5:1 y 1:5) pero es generalmente de aproximadamente 1:1.

Adyuvantes de sales de aluminio

40 Pueden usarse los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan solo por conveniencia, ya que ninguno es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (*por ejemplo*, véase el capítulo 9 de la referencia 131). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se usan generalmente como adyuvantes.

45 Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse por la fórmula $AlO(OH)$, puede distinguirse de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, mediante espectroscopía infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un fuerte desnivel a $3090\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ [capítulo 9 de la ref. 131]. El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por el ancho de la banda de difracción a media altura (WHH), mostrando las partículas poco cristalinas un mayor ensanchamiento de la línea debido a los tamaños cristalinos menores. El área superficial aumenta a medida que aumenta la WHH, y se ha demostrado que los adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad de adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (*por ejemplo* tal como se observa en micrografías electrónicas de transmisión) es típica para los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es típicamente aproximadamente 11, *es decir*, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han comunicado capacidades de adsorción de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos, que a menudo contienen también una pequeña cantidad de sulfato (*es decir*, sulfato de hidroxisulfato de aluminio). Pueden obtenerse por precipitación, y las condiciones y concentraciones de reacción durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato para el hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos tienen generalmente una relación molar PO_4/Al entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse de AlPO_4 estrictos por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta a $200 \text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales [cap. 9 de ref. 131]

La relación molar $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio será en general entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente $0,95 \pm 0,1$. El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio será generalmente particulado (por ejemplo, morfología tipo placa como se ve en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han comunicado capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución del hidroxilo por fosfato, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la concentración de reactivos utilizados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato está asociado con un PZC más ácido) o añadiendo un tampón, tal como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5 *por ejemplo*, aproximadamente 5,7.

Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar composiciones de la invención pueden contener un tampón (*por ejemplo* un fosfato o una histidina o un tampón Tris), pero no siempre es necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y están libres de pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuoso libres, *por ejemplo*, presentes a una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM, y más preferentemente de aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden contener cloruro de sodio.

La invención puede usar una mezcla tanto de hidróxido de aluminio como de fosfato de aluminio. En este caso, puede hacer más fosfato de aluminio que hidróxido, *por ejemplo*, una relación en peso de al menos 2:1, *por ejemplo* $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc.

La concentración de Al^{+++} en una composición para su administración a un paciente es preferentemente menor de 10 mg/ml, *por ejemplo* $\leq 5 \text{ mg/ml}$, $\leq 4 \text{ mg/ml}$, $\leq 3 \text{ mg/ml}$, $\leq 2 \text{ mg/ml}$, $\leq 1 \text{ mg/ml}$, etc. Un intervalo preferido es entre 0,3 y 1 mg/ml.

Antígenos adicionales

Además de los sacáridos y/o conjugados modificados, la composición puede comprender otros componentes antigénicos. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más sacáridos adicionales (modificados o no según la invención). Por ejemplo, la composición puede comprender sacáridos de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis* (*por ejemplo*, además de un sacárido MenA modificado). Estos se conjugarán típicamente con proteínas transportadoras, y sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* pueden conjugarse con la misma o diferentes proteínas transportadoras. Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, se prefiere que la relación (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC sea mayor de 1 (*por ejemplo* 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior). Se ha observado una inmunogenicidad mejorada del componente MenA cuando está presente en exceso (masa/dosis) con respecto al componente MenC [138].

La composición también puede comprender antígenos proteicos.

Los antígenos que pueden incluirse en la composición de la invención incluyen:

- un antígeno proteico del serogrupo B de *N. meningitidis* (véase a continuación).
- una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis*, tal como las desveladas en las ref. 139, 140, 141, 142 etc.
- antígenos de *Helicobacter pylori* tales como CagA [143 a 146], VacA [147, 148], NAP [149, 150, 151], HopX [*por ejemplo* 152], HopY [*por ejemplo* 152] y/o ureasa.
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [*por ejemplo* 153, 154, 155].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como un virus inactivado [*por ejemplo* 156, 157].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [*por ejemplo*., 157, 158].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [*por ejemplo* 159].
- un antígeno acelular de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también junto con pertactina y/o aglutinígenos 2 y 3 [*por ejemplo*, las ref. 160 y 161].
- un antígeno celular de *Bordetella pertussis*.

- un antígeno de difteria, tal como un toxoide de difteria [por ejemplo, capítulo 3 de la ref. 162] *por ejemplo*, el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo 163].
- uno o más antígenos de la polio [por ejemplo 164, 165] tal como el virus de la polio inactivado (IPV)
- un antígeno del tetanos, tal como un toxoide tetanoso [por ejemplo, capítulo 4 de la ref. 162].
- 5 - un antígeno de sacárido, de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, las ref. 166 a 174].
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubéola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la ref. 162].
- un antígeno de *N.gonorrhoeae*.
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 182].
- 10 - un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 183].
- uno o más antígenos de la rabia [por ejemplo 184] tal como un virus inactivado liofilizado [por ejemplo, 185, RabAvert™].
- uno o más antígenos de influenza [por ejemplo, capítulo 19 de la ref. 162], tal como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- 15 - un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo 186].
- un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) [por ejemplo, 187, 188].
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B).
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A) [por ejemplo, 188, 189, 190].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 191].
- 20 - un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo, 192, 193, 194].
- un antígeno del virus del herpes simple (HSV). Un antígeno de HSV preferido para su uso con la invención es una glicoproteína de membrana gD. Se prefiere el uso de gD de una cepa de HSV-2 (antígeno de "gD2"). La composición puede usar una forma de gD en la que se ha suprimido la región de anclaje de membrana C-terminal [195] *por ejemplo*, una gD truncada que comprende los aminoácidos 1-306 de la proteína natural con la adición de aparagina y glutamina en el extremo C-terminal. Esta forma de la proteína incluye el péptido señal que se escinde para producir una proteína madura de 283 aminoácidos. La eliminación del anclaje permite que la proteína se prepare en forma soluble.
- 25 - un antígeno del virus del papiloma humano (HPV). Los antígenos de HPV preferidos para su uso con la invención son proteínas de la cápside L1, que pueden ensamblarse para formar estructuras conocidas como partículas pseudovíricas (VLP). Las VLP pueden producirse por expresión recombinante de L1 en células de levadura (*por ejemplo* en *S.cerevisiae*) o en células de insecto (*por ejemplo* en células de *Spodoptera*, tal como células de *S.frugiperda*, o en células de *Drosophila*). Para las células de levadura, los vectores plasmídicos pueden portar el uno o más genes L1; para las células de insecto, los vectores de baculovirus pueden portar el uno o más genes L1. Más preferentemente, la composición incluye VLP de L1 de cepas de HPV-16 y HPV-18. Esta combinación bivalente ha demostrado ser altamente eficaz [196]. Además de las cepas HPV-16 y HPV-18, también es posible incluir VLP de L1 de cepas de HPV-6 y HPV-11. También es posible el uso de cepas oncogénicas de VPH. Una vacuna puede incluir entre 20-60 µg/ml (por ejemplo aproximadamente 40 µg/ml) de L1 por cepa de HPV.
- 30 - un antígeno de un virus de la familia de los flaviviridae (género flavivirus), tal como el virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, cuatro serotipos de virus del dengue, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas y el virus del Nilo Occidental.
- 35 - un antígeno de pestivirus, tal como el virus de la fiebre porcina clásica, el virus de la diarrea vírica bovina y/o el virus de la enfermedad fronteriza.
- un antígeno de parvovirus *por ejemplo*, del parvovirus B 19.
- una proteína priónica (por ejemplo, la proteína prión CJD)
- 40 - una proteína amiloide, tal como un péptido beta [197]
- 45 - un antígeno de cáncer, tal como los enumerados en la Tabla 1 de la ref. 198 o en las tablas 3 y 4 de la ref. 199.

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

Los antígenos proteicos tóxicos pueden desintoxicarse cuando sea necesario (*por ejemplo*, destoxicación de la toxina pertussis por medios químicos y/o genéticos [161]).

- 50 Cuando se incluye un antígeno diftérico en la composición, se prefiere también incluir antígenos del tétanos y antígenos de pertussis. De forma similar, cuando se incluye un antígeno tetánico, se prefiere también incluir antígenos de difteria y pertussis. De forma similar, cuando se incluye un antígeno de pertussis, se prefiere también incluir antígenos de difteria y tétanos.

Los antígenos pueden adsorberse a una sal de aluminio.

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

- 60 Como alternativa al uso de antígenos de proteínas en la composición de la invención, puede usarse ácido nucleico que codifica el antígeno [por ejemplo, las ref. 200 a 208]. Por lo tanto, los componentes de proteínas de las composiciones de la invención pueden reemplazarse así por ácido nucleico (preferentemente ADN, *por ejemplo*, en forma de un plásmido) que codifica la proteína.

Antígenos meningocócicos no sacáridos

Aunque los sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y meningocócicos pueden usarse para generar inmunidad protectora, el mismo enfoque no ha funcionado para el serogrupo B. Por lo tanto, los sacáridos y conjugados modificados de la invención pueden usarse juntos (por ejemplo, por separado o en mezcla) con antígenos meningocócicos que no están basados en sacáridos capsulares, *por ejemplo*, antígenos proteínicos, lipopolisacáridos o vesículas de membrana.

Se han comunicado secuencias genómicas para los serogrupos A [209] y B [210,211] meningocócicos, y se pueden seleccionar antígenos proteicos adecuados a partir de los polipéptidos codificados [por ejemplo, ref. 212-217]. Los antígenos candidatos han sido manipulados para mejorar la expresión heteróloga [ref. 218 a 220].

Una composición preferida incluye una proteína Tbp y una proteína Hsf [221]. Hsf es una proteína autotransportadora [222-224], también conocida como nhhA [224], GNA0992 [212] o NMB0992 [210]. Tbp es la proteína de unión a la transferrina [225-228], e incluye TbpA y TbpB y las formas de alto peso molecular y bajo peso molecular de TbpA y TbpB. Tbp incluye las proteínas individuales descritas anteriormente y los complejos de las proteínas y cualquier otra proteína o complejos de los mismos capaces de unirse a la transferrina. Aunque la Tbp puede referirse a las formas de TbpA o TbpB de alto o bajo peso molecular, se prefiere que estén presentes formas tanto de alto peso molecular como de bajo peso molecular de TbpA y/o TbpB. Más preferentemente, está presente TbpA de alto peso molecular y bajo peso molecular.

Otra composición preferida incluye al menos un antígeno seleccionado de cada una de al menos dos categorías diferentes de proteína que tienen funciones diferentes dentro de Neisseria. Los ejemplos de tales categorías de proteínas son: adhesinas, proteínas autotransportadoras, toxinas, proteínas integrales de la membrana externa y proteínas de adquisición de hierro. Estos antígenos se pueden seleccionar como se indica a continuación, usando la nomenclatura de referencia 229: al menos una adhesina de Neisseria seleccionada del grupo que consiste en FhaB, NspA PilC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119 y NadA; al menos un autotransportador de Neisseria seleccionada del grupo que consiste en Hsf, Hap, proteasa IgA, AspA, y NadA; al menos una toxina de Neisseria seleccionada del grupo que consiste en FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD, NM-ADPRT (NMB1343) y uno o ambos del inmunotipo de LPS L2 y el inmunotipo de LPS L3; al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria seleccionada del grupo que consiste en TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, Lipo28 (GNA2132), Sibp, NMB0964, NMB0293, FbpA, Bcp, BfrA, BfrB y P2086 (XthA); al menos una proteína asociada a la membrana de Neisseria, preferentemente, la proteína de membrana externa, en particular la proteína de membrana externa integral, seleccionada del grupo que consiste en PilQ, OMP85, FhaC, NspA, TbpA, LbpA, TspA, TspB, TdfH, PorB, MltA, HpuB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA (GNA1946), NMB1124, NMB1162, NMB1220, NMB1313, NMB1953, HtrA, y PLDA (OMPLA). Se dice que estas combinaciones de antígenos de Neisseria conducen a un aumento sorprendente de la eficacia de la vacuna contra la infección por Neisseria [229].

Las composiciones particularmente preferidas incluyen uno o más de los siguientes cinco antígenos [230]: (1) una proteína "NadA", preferentemente en forma oligomérica (por ejemplo, en forma trimérica); (2) una proteína "741"; (3) una proteína "936"; (4) una proteína "953"; y (5) una proteína "287".

"NadA" (adhesina A de Neisseria) de MenB se desvela como la proteína "961" en la referencia 215 (SEQ IDs 2943 y 2944) y como "NMB1994" en la referencia 210 (véase también el acceso al GenBank GI: 11352904 y 7227256). Un estudio detallado de la proteína se puede encontrar en la referencia 231. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, NadA puede adoptar diversas formas. Las formas preferidas de NadA son variantes de truncamiento o delección de la secuencia de tipo silvestre, tales como las desveladas en las referencias 218 a 220. En particular, se prefiere NadA sin su anclaje de membrana C-terminal (por ejemplo, delección de los residuos 351-405 para la cepa 2996).

La proteína "741" de MenB se desvela en la referencia 215 (SEQ IDs 2535 y 2536) y como "NMB1870" en la referencia 210 (véase también el número de acceso al GenBank GI: 7227128). La proteína correspondiente en el serogrupo A [209] tiene el número de acceso al GenBank 7379322. 741 es naturalmente una lipoproteína. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 741 puede adoptar diversas formas. Las formas preferidas de 741 son variantes de truncamiento o delección de la secuencia de tipo silvestre, tales como las desveladas en las referencias 218 a 220. En particular, el extremo N de 741 puede eliminarse hasta e incluyendo su secuencia poliglicina (*es decir*, delección de los residuos 1 a 72 para la cepa MC58), que a veces puede distinguirse en el presente documento por el uso de un prefijo "ΔG". Esta delección puede mejorar la expresión. La delección también elimina el sitio de lipidación de 741. Se pueden encontrar varias secuencias 741 en las SEQ IDs 1 a 22 de la referencia 220, en las SEQ IDs 1 a 23 de la referencia 232, y en las SEQ IDs 1-299 de la referencia 233.

La proteína "936" del serogrupo B se desvela en la referencia 215 (SEQ IDs 2883 y 2884) y como "NMB2091" en la referencia 210 (véase también el número de acceso al GenBank GI: 7227353). El gen correspondiente en el serogrupo A [209] tiene el número de acceso al GenBank 7379093. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 936 puede adoptar diversas formas. Las formas preferidas de 936 son variantes de truncamiento o delección de la secuencia de tipo silvestre, tales como las desveladas en las referencias 218 a 220. En particular, el péptido líder N-terminal de 936 puede eliminarse (*por ejemplo*, eliminación de los residuos 1 a 23

para la cepa MC58, para dar 936^(NL)).

La proteína "953" del serogrupo B se desvela en la referencia 215 (SEQ IDs 2917 y 2918) y como "NMB1030" en la referencia 210 (véase también el número de acceso al GenBank GI: 7226269). La proteína correspondiente en el serogrupo A [209] tiene el número de acceso al GenBank 7380108. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 953 puede adoptar diversas formas. Las formas preferidas de 953 son variantes de truncamiento o delección de la secuencia de tipo silvestre, tales como las desveladas en las referencias 218 a 220. En particular, el péptido líder N-terminal de 953 puede eliminarse (*por ejemplo*, eliminación de los residuos 1 a 19 para la cepa MC58).

La proteína "287" del serogrupo B se desvela en la referencia 215 (SEQ IDs 3103 y 3104), como "NMB2132" en la referencia 210, y como "GNA2132" en la referencia 212 (véase también el número de acceso al GenBank GI:7227388). La proteína correspondiente en el serogrupo A [209] tiene el número de acceso al GenBank 7379057. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 287 puede adoptar diversas formas. Las formas preferidas de 287 son variantes de truncamiento o delección de la secuencia de tipo silvestre, tales como las desveladas en las referencias 218 a 220. En particular, el extremo N de 287 puede eliminarse hasta e incluyendo su secuencia poli-glicina (*por ejemplo*, eliminación de los residuos 1 a 24 para la cepa MC58, para dar Δ G287).

La proteína 287 es preferentemente de la cepa 2996 o, más preferentemente, de la cepa 394/98. La proteína 741 es preferentemente de las cepas del serogrupo B MC58, 2996, 394/98, o 95N477, o de la cepa del serogrupo C 90/18311. La cepa MC58 es más preferida. Las proteínas 936, 953 y NadA son preferentemente de la cepa 2996. Cuando una composición incluye un antígeno proteico particular (*por ejemplo*, 741 o 287), la composición puede incluir ese antígeno en más de una forma de variante *por ejemplo*, la misma proteína, pero de más de una cepa. Estas proteínas pueden incluirse como proteínas en tándem o separadas.

Otros antígenos polipeptídicos MenB que pueden incluirse en las composiciones de la invención incluyen los que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO:650 de ref. 213; SEQ ID NO:878 de ref. 213; SEQ ID NO:884 de ref. 213; SEQ ID NO:4 de ref. 214; SEQ ID NO:598 de ref. 215; SEQ ID NO:818 de ref. 215; SEQ ID NO:864 de ref. 215; SEQ ID NO:866 de ref. 215; SEQ ID NO:1196 de ref. 215; SEQ ID NO:1272 de ref. 215; SEQ ID NO:1274 de ref. 215; SEQ ID NO:1640 de ref. 215; SEQ ID NO:1788 de ref. 215; SEQ ID NO:2288 de ref. 215; SEQ ID NO:2466 de ref. 215; SEQ ID NO:2554 de ref. 215; SEQ ID NO:2576 de ref. 215; SEQ ID NO:2606 de ref. 215; SEQ ID NO:2608 de ref. 215; SEQ ID NO:2616 de ref. 215; SEQ ID NO:2668 de ref. 215; SEQ ID NO:2780 de ref. 215; SEQ ID NO:2932 de ref. 215; SEQ ID NO:2958 de ref. 215; SEQ ID NO:2970 de ref. 215; SEQ ID NO:2988 de ref. 215, o un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica que: (a) tiene el 50 % o más de identidad (*por ejemplo*, el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más) con respecto a dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, en las que n es 7 o más (*por ejemplo*, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos para (b) comprenden un epitopo de la secuencia relevante. Se pueden incluir más de uno (*por ejemplo* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más) de estos polipéptidos.

En algunas realizaciones, sin embargo, la composición de la invención incluye la misma proteína pero procedente de más de una cepa. Se ha descubierto que este enfoque es eficaz con la proteína 741. Esta proteína es un antígeno extremadamente eficaz para provocar respuestas de anticuerpos anti-meningocócicos, y se expresa en todos los serogrupos meningocócicos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos, y que uno de ellos se divide de nuevo para dar tres variantes en total [234], y mientras que el suero elevado contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo variante, no es activo contra las cepas que expresan una de las dos variantes, *es decir*, existe protección cruzada intra-variantes, pero no protección cruzada inter-variantes [232,234]. Para una máxima eficacia de la cepa cruzada, por lo tanto, se prefiere que una composición incluya más de una variante de la proteína 741.

Las composiciones de la invención incluyen un pequeño número (*por ejemplo*, menor de t antígenos, donde t es 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3) de las proteínas purificadas del serogrupo B. Las proteínas se expresan preferentemente de forma recombinante en un huésped heterólogo y luego se purifican. Para una composición que incluye t antígenos MenB, puede haber t polipéptidos separados pero, pero para reducir aún más la complejidad, se prefiere que al menos dos de los antígenos se expresen como una única cadena polipeptídica (una proteína "híbrida" [ref. 218 a 220]) *es decir*, de tal forma que t antígenos formen menos de t polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas principales: en primer lugar, una proteína que puede ser inestable o poco expresada por sí sola puede ser asistida mediante la adición de un compañero híbrido adecuado que supera el problema; en segundo lugar, la fabricación comercial se simplifica, ya que solo se necesita emplear una expresión y purificación para producir dos proteínas separadamente útiles. Un híbrido incluido en una composición de la invención puede comprender dos o más (*es decir* 2, 3, 4 o 5) de las cinco proteínas enumeradas anteriormente. Se prefieren híbridos que consisten en dos de las cinco proteínas.

Otra composición preferida incluye lipooligosacárido del serogrupo B (LOS) [235]. LOS pueden usarse además del polipéptido o polipéptidos del serogrupo B, o puede usarse en lugar de ellos.

También pueden usarse vesículas de membrana en las composiciones. Estas vesículas pueden ser cualquier

vesícula proteoliposómica obtenida alterando una membrana externa meningocócica para formar vesículas de la membrana externa que incluyen componentes proteicos de la membrana externa. Las "OMV" se preparan artificialmente a partir de bacterias (por ejemplo, por tratamiento con detergente) y son, por tanto, distintas de las microvesículas (MV [236]) y "OMV nativas" ("NOMV" [237]), ambas de las cuales son vesículas de membrana de origen natural que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y se liberan en el medio de cultivo. Las MV pueden obtenerse cultivando *Neisseria* en medio de cultivo de caldo, separando células enteras de las ampollas más pequeñas en el medio de cultivo de caldo y, a continuación, recogiendo las MV del medio agotado de células. Las cepas para su uso en la producción de MV pueden seleccionarse generalmente en base a la cantidad de MV producidas en el cultivo, *por ejemplo*, las ref. 238 y 239 describen *Neisseria* con alta producción de MV. Las vesículas también pueden obtenerse a partir de cepas desactivadas de *mltA* [240].

Para reducir la actividad pirógena, se prefiere que la bacteria tenga niveles bajos de endotoxina (LPS). Se conocen bacterias mutantes adecuadas, *por ejemplo*, *Neisseria* mutante [241] y *Helicobacter* mutante [242]. Los procedimientos para preparar membranas externas agotadas de LPS a partir de bacterias Gram-negativas se desvelan en la referencia 243.

La bacteria puede ser una bacteria de tipo silvestre, o puede ser una bacteria recombinante. Las bacterias recombinantes preferidas sobreexpresan (en relación con la cepa de tipo silvestre correspondiente) inmunógenos tales como NspA, proteína 287 [244], proteína 741 [244], TbpA, TbpB, superóxido dismutasa [245], *etc.* La bacteria puede expresar más de una proteína de membrana externa de clase I PorA *por ejemplo* 2, 3, 4, 5 o 6 de los subtipos PorA: P1.7,16; P1.5,2; P1.19,15; P1.5c,10; P1.12,13; y P1.7h,4 [por ejemplo, las ref. 246 y 247].

Otras bacterias recombinantes que pueden usarse con la invención tienen una o más mutaciones para disminuir (o, preferentemente, desactivar) la expresión de productos génicos particulares (*por ejemplo* véanse las ref. 248 y 249). Los genes preferidos para la disminución y/o desactivación incluyen: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, y/o TbpB [248]; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, PorA, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, y/o TbpB [249]; (c) transglicosilasa lítica NMB0033 [250]; (d) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GalE, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, y/o TbpB [251]; y (e) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, Opa, OpC, PilC, PorA, PorB, SiaD, SynA, SynB, y/o SynC [252].

Las cepas preferidas dentro del serogrupo B como fuente de estos antígenos no sacáridos son las cepas MC58, 2996, H44/76, 394/98 y New Zealand 98/254. Los mejores serotipos y cepas a utilizar, sin embargo, dependerán de las cepas prevalentes en una localización geográfica determinada. Por ejemplo, el meningococo puede ser de cualquier serotipo (*por ejemplo* 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, *etc.*), de cualquier serosubtipo (P1.2; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.7,16; P1.7,16b; P1.9; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.15; P1.21,16; P1.22,14; *etc.*) y de cualquier inmunotipo (*por ejemplo* L1; L3,3,7; L10; *etc.*), y las cepas preferidas incluyen: (a) B:4:P1.4; (b) B:4:P1.15; (c) B:15:P1.7,16; y (d) B:4:P1.7b,4. El meningococo puede ser de cualquier linaje adecuado, incluyendo linajes hiperinvasivos e hipervirulentos, *por ejemplo*, cualquiera de los siguientes siete linajes hipervirulentos: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-1; complejo ET-5; complejo ET-37; agrupación A4; linaje 3. Estos linajes se han definido mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), pero también se ha utilizado la tipificación de secuencia multilocus (MLST) para clasificar los meningococos [ref. 253] *por ejemplo*, el complejo ET-37 es el complejo ST-11 por MLST, el complejo ET-5 es ST-32 (ET-5), el linaje 3 es ST-41/44, *etc.*

Los antígenos no sacáridos pueden usarse para inducir una respuesta de anticuerpo bactericida en suero que es eficaz contra dos o tres de los linajes hipervirulentos de MenB A4, ET-5 y el linaje 3. También pueden inducir respuestas de anticuerpos bactericidas contra uno o más del subgrupo de linajes hipervirulentos I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o complejo ET-37, y contra otros linajes, por ejemplo, linajes hiperinvasivos. Estas respuestas de anticuerpos se miden convenientemente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [por ejemplo, véase la nota final 14 de la referencia 212]. La actividad bactericida en suero (SBA) mide la muerte bacteriana mediada por el complemento, y puede ser ensayada usando complemento de ser humano o bebé conejo. Las normas de la OMS requieren una vacuna para inducir al menos un aumento de 4 veces en SBA en más del 90 % de los receptores.

La composición no necesita inducir anticuerpos bactericidas contra cada una de las cepas MenB dentro de estos linajes hipervirulentos; en su lugar, para un grupo dado de cuatro cepas más de meningococo de serogrupo B dentro de un linaje hipervirulento particular, los anticuerpos inducidos por la composición con bactericidas contra al menos el 50 % (*por ejemplo*, el 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) del grupo. Los grupos preferidos de cepas incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR, y CU. El suero tiene preferentemente un título bactericida de al menos 1024 (*por ejemplo* 2¹⁰, 2¹¹, 2¹², 2¹³, 2¹⁴, 2¹⁵, 2¹⁶, 2¹⁷, 2¹⁸ o superior, preferentemente, al menos 2¹⁴) *es decir*, el suero es capaz de eliminar al menos el 50 % de las bacterias de ensayo de una cepa particular cuando se diluye 1/1024, como se describe en la referencia 212.

Las composiciones preferidas pueden inducir respuestas bactericidas frente a las siguientes cepas de meningococo del serogrupo B: (i) del grupo A4, cepa 961-5945 (B:2b:P1.21,16) y/o cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo ET-5, cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) y/o cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) del linaje 3, cepa 394/98 (B:4:P1.4) y/o cepa BZ198 (B:NT:-). Las composiciones más preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las cepas 961-5945,

44/76 y 394/98. Las cepas 961-5945 y G2136 son ambas cepas de referencia de MLST de *Neisseria* [id. 638 y 1002 en la ref. 254]. Cepa MC58 está ampliamente disponible (*por ejemplo* ATCC BAA-335) y fue la cepa secuenciada en la figura 210. La cepa 44/76 se ha usado y caracterizado ampliamente (por ejemplo, ref. 255) y es una de las cepas de referencia de MLST de *Neisseria* [id. 237 en la ref. 254; fila 32 de la Tabla 2 en la ref. 256]. La cepa 394/98 se aisló originalmente en Nueva Zelanda en 1998, y ha habido varios estudios publicados que usan esta cepa (por ejemplo, las referencias 257 y 258). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia de MLST [id. 409 en la ref. 254; fila 41 de la Tabla 2 en la referencia. 256]. La composición puede inducir adicionalmente una respuesta bactericida frente a la cepa de serogrupo W135 LNP17592 (W135:2a:P1.5,2), a partir del complejo ET-37.

General

- 10 El término "que comprende" incluye "que incluye", así como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

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

El término "alquilo" se usa en el presente documento para referirse a grupos alquilo tanto en forma lineal como ramificada. Sin embargo, el término "alquilo" se refiere habitualmente a grupos alquilo en formas rectas. El grupo alquilo puede estar interrumpido con 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre -O-, -NH- o -S-. El grupo alquilo puede estar también interrumpido con 1, 2 o 3 dobles y/o triples enlaces. Sin embargo, el término "alquilo" se refiere habitualmente a grupos alquilo que no tienen interrupciones de heteroátomo o interrupciones de doble o triple enlace. Cuando se hace referencia a alquilo C_{1-6} , se refiere a que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (*por ejemplo* C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6).

El término "alquileo" se utiliza en el presente documento para referirse a un grupo alquilo divalente, como se ha definido anteriormente. Cuando se hace referencia a alquileo C_{1-5} , se refiere a que el grupo alquileo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 5 (*por ejemplo* C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5). De forma similar, cuando se hace referencia a alquileo C_{1-4} , se refiere a que el grupo alquileo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 4 (*por ejemplo* C_1 , C_2 , C_3 , C_4).

La expresión "grupo amino" incluye grupos de fórmula $-NH_2$ o $-NH-E$, donde E es un grupo protector de nitrógeno. Los ejemplos de grupos protectores de nitrógeno típicos se han descrito anteriormente.

- 30 El término "amina" se refiere a un grupo de fórmula $-NH_2$, a menos que el contexto indique otra cosa.

La expresión "sacárido capsular modificado" se refiere a un sacárido que se puede obtener a partir de un sacárido capsular nativo mediante una modificación adecuada. De este modo, la secuencia básica de unidades monosacárido repetidas en el sacárido capsular nativo se retiene en los sacáridos capsulares modificados de la presente invención.

El término "sacárido" incluye tanto oligosacáridos (por ejemplo, que contienen de 2 a 39 unidades de monosacárido) como polisacáridos (por ejemplo, que contienen 40 o más unidades de monosacárido). Como se encuentra naturalmente en las bacterias, los sacáridos capsulares nativos generalmente toman la forma de polisacáridos. Los polisacáridos pueden manipularse para dar oligosacáridos más cortos. Los oligosacáridos pueden obtenerse por purificación y/o despolimerización seguida de un dimensionado del polisacárido nativo (por ejemplo, mediante hidrólisis en ácido suave, por calentamiento, por cromatografía de dimensionamiento *etc.*).

40 En los casos donde se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse a partir de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE) y, en particular, libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar las células en total ausencia de materiales procedentes de animales.

Se apreciará que los grupos ionizables pueden existir en la forma neutra mostrada en las fórmulas en el presente documento, o pueden existir en forma cargada, *por ejemplo*, dependiendo de pH. Por lo tanto, un grupo fosfato puede mostrarse como $-P-O-(OH)_2$, esta fórmula es meramente representativa del grupo fosfato neutro, y se incluyen otras formas cargadas por la invención. De forma similar, las referencias en el presente documento a grupos catiónicos y aniónicos se deben tomar para referirse a la carga que está presente en ese grupo en condiciones fisiológicas, *por ejemplo*, cuando una amina $-NH_2$ se protona para dar el grupo $-NH^{3+}$ catiónico, esta protonación es una que se produce a pH fisiológico. Además, cuando se desprotona un carboxilo $-COOH$ para dar el grupo $-COO^-$ aniónico, esta protonación es una que puede ocurrir a pH fisiológico. Además, la invención incluye sales de las formas cargadas de moléculas de la invención. Los anillos de azúcar pueden existir en forma abierta y cerrada y, aunque las formas cerradas se muestran en fórmulas estructurales en el presente documento, las formas abiertas también se incluyen por la invención. De forma similar, la invención incluye formas isoméricas de las moléculas de la invención, incluyendo tautómeros (por ejemplo, tautómeros de imina/enamina), confómeros, enantiómeros, diaestereoisómeros, *etc.*

Después del serogrupo, la clasificación meningocócica incluye serotipo, serosubtipo y después inmunotipo, y la nomenclatura estándar enumera serogrupo, serotipo, serosubtipo e inmunotípico, separados cada uno por un colon *por ejemplo*, B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro del serogrupo B, algunos linajes causan enfermedades con frecuencia (hiper-invasivos), algunos linajes causan formas más graves de enfermedad que otros (hipervirulentos), y otros raramente causan enfermedad en absoluto. Se reconocen siete linajes hipervirulentos, a saber, los subgrupos I, III e IV-1, complejo ET-5, complejo ET-37, el grupo A4 y el linaje 3. Estos se han definido por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), pero también se ha utilizado tipificado de secuencias multilocus para clasificar los meningococos [ref. 256].

Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 proporciona un esquema para la síntesis química de conjugados CRM₁₉₇-MenA. Las estructuras predominantes de "MenA10/90" (oligosacárido MenA que comprende un grupo de bloqueo 4,5-dihidroxipentilcarbamato en aproximadamente el 10 % de las unidades de monosacárido y un grupo de bloqueo 2-hidroxietilcarbamato en aproximadamente el 90 % de las unidades de monosacárido) y "MenA10/0" (oligosacárido MenA que comprende un grupo de bloqueo 4,5-dihidroxipentilcarbamato en aproximadamente el 10 % de las unidades de monosacárido).
- 15 La figura 2 proporciona el perfil analítico de intercambio aniónico a 214 nm de oligosacáridos MenA antes (panel A) y después del dimensionamiento (panel B).
- La figura 3 proporciona el espectro de ¹H RMN de 600 MHz a 25 °C del oligosacárido MenA sin modificación química (panel A), oligosacárido MenA10/90 (panel B) y oligosacárido MenA10/0 (panel C).
- 20 La figura 4 compara el porcentaje de fosfomonoéster desarrollado durante el almacenamiento a 37 °C por oligosacárido MenA sin modificación química, oligosacárido MenA10/90 y oligosacárido MenA10/0.
- La figura 5 proporciona el espectro de ³¹P RMN del oligosacárido MenA.
- La figura 6 compara el grado de polimerización (DP), medido por ³¹P RMN, durante el almacenamiento a 37 °C del oligosacárido MenA sin modificación química, oligosacárido MenA10/90 y oligosacárido MenA10/0.
- 25 La figura 7 proporciona el perfil SDS-Page de conjugados de oligosacáridos CRM-MenA: Carril M - Marcadores Mw; Carril 1 - CRM; Carril 2 - CRM-MenA10/90; y Carril 3 - CRM-MenA10/0.
- La figura 8 compara el sacárido libre (FS) liberado durante el almacenamiento a 37 °C de conjugados de oligosacárido CRM-MenA10/90 y conjugados de oligosacárido CRM-MenA10/0.
- 30 La figura 9 compara el porcentaje de fosfomonoéster desarrollado durante el almacenamiento a 37 °C mediante conjugados de oligosacárido CRM-MenA10/90 y conjugados de oligosacárido CRM-MenA10/0.

Modos para llevar a cabo la invención

Ejemplo de referencia 1

Modificación del oligosacárido Men A

Hidrólisis controlada del polisacárido MenA

- 35 Los oligosacáridos MenA se generaron por hidrólisis química de una solución de polisacárido MenA. En resumen, el polisacárido MenA se solubilizó a una concentración final de 10 mg/ml en tampón acetato 50 mM, pH 4,75. La solución se calentó a 73 °C hasta que se alcanzó un grado de polimerización (DP) de aproximadamente 10. La hidrólisis se controló monitorizando la variación de la actividad óptica de la solución (α Hg 365 nm) con el tiempo de acuerdo con la siguiente ecuación: $DP = 1/\{0,5817[1-(\alpha/\alpha_m)]\}$, donde α_m es el valor medio de la potencia óptica rotatoria de 6 muestras cuando la temperatura de la solución es de 50 °C y α_t es la potencia de rotación óptica en el instante t. La hidrólisis se detuvo cuando se alcanzó el valor de α correspondiente a un DP de 10. Al final de la reacción de hidrólisis, la solución se enfrió a temperatura ambiente y el pH se corrigió a aproximadamente 6,5.

Fraccionamiento del tamaño del oligosacárido MenA

- 45 La hidrólisis ácida controlada del polisacárido MenA genera una polidispersión con el DP medio diana. Para la preparación de conjugado, la polidispersión de oligosacáridos puede restringirse adicionalmente usando un fraccionamiento de tamaño de dos etapas. Estas etapas de dimensionamiento típicamente cambian la DP de los oligosacáridos MenA de un valor de aproximadamente 10 a un valor entre 15 y 20, medida por la relación molar entre los valores de fósforo total (Pt) y de fosfatomonoéster terminal (Pm). La concentración de Pt se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito en la referencia 259 y se determinó Pm midiendo el fosfato inorgánico liberado por reacción enzimática con fosfatasa ácida de patata [260].

En resumen, el hidrolizado de MenA se filtró primero a través de una membrana de flujo tangencial de 30 KDa para

eliminar especies de alto peso molecular. Durante este procedimiento, el producto se concentró aproximadamente 10 veces y después se diafiltró contra 13 volúmenes de tampón acetato 5 mM, pH 6,5. El permeado, que contenía los oligosacáridos deseados, se recogió mientras se retiraba la fracción retenida.

5 En la segunda etapa, el permeado se fraccionó por cromatografía en columna de intercambio aniónico. Esta etapa está diseñada para eliminar las especies de bajo Pm caracterizadas por un DP de menos de 6, que pueden ser poco inmunógenas [261]. La mezcla de oligosacáridos obtenida a partir de la ultrafiltración de 30 KDa se cargó sobre una columna rellena con Q-Sepharose Fast Flow previamente equilibrada con acetato sódico 5 mM, pH 6,5. La relación oligosacárido/volumen relleno era de 17 mg/ml de resina rellena. Después, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna (vc) del tampón de equilibrado. Después se aplicó un lavado de 10 vc de tampón de acetato sódico 5 mM/NaCl 125 mM, pH 6,5, a la columna para eluir oligosacáridos de DP \leq 6. La fracción de oligosacáridos deseada se recuperó entonces por elución con tampón de acetato sódico 5 mM/NaCl 500 mM, pH 6,5. El desprendimiento con 5 vc de NaCl 2 M y la desinfección con NaOH 1 M completaron el procedimiento.

15 Se utilizó cromatografía analítica de intercambio aniónico para medir la polidispersión de oligosacáridos antes y después del fraccionamiento. En resumen, las polidispersiones de oligosacárido MenA se analizaron por HPLC usando una columna Mono-Q HR 5/5. Después de equilibrar con agua, se cargó en la columna 1 ml de muestra que contenía aproximadamente 1 mg de sacárido, que luego se desarrolló con un gradiente lineal del 0 al 60 % de NaCl 1 M a un caudal de 0,5 ml. El cromatograma se monitorizó a 214 nm. Se usó una preparación estándar de un oligosacárido MenA monodisperso que tenía un DP definido de 5 y 6, respectivamente, como se evidenció mediante Espectrometría de Masas y ^1H RMN, para identificar la presencia o eliminación de oligosacáridos que tenían un DP menor que 6 en las muestras de polidispersión ensayadas. La figura 2 muestra los perfiles analíticos del hidrolizado (panel A) en comparación con el oligosacárido MenA clasificado (panel B).

Intercambio contraiónico

25 El eluato de Q-Sepharose del procedimiento de fraccionamiento de tamaño de dos etapas se ultrafiltró en una membrana de 3 KDa con el fin de intercambiar el contraión de sodio con tetrabutilamonio, que confiere solubilidad al oligosacárido en disolventes no acuosos. En resumen, la solución de oligosacárido MenA se diafiltró contra 4 volúmenes de bromuro de tetrabutilamonio 10 mM seguido de 10 volúmenes de agua. Se recogió la fracción retenida, que contenía el producto deseado, y se desechó el permeado. Se eliminó el agua del material retenido por evaporación rotatoria.

Modificación química del oligosacárido MenA

30 El oligosacárido MenA se modificó usando activación de 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) seguido de reacción con 1-amino-4,5-pentandiol (APD) en solitario o APD y 2-aminoetanol (ETA), con el fin de obtener dos estructuras diana diferentes (figura 1):

35 i) Oligosacárido MenA que comprende un grupo de bloqueo de 4,5-dihidroxipentilcarbamato sobre aproximadamente el 10 % de las unidades de monosacárido y un grupo de bloqueo 2-hidroxietilcarbamato sobre aproximadamente el 90 % de las unidades de monosacárido (MenA10/90); y y

ii) Oligosacárido MenA que comprende un grupo de bloqueo 4,5-dihidroxipentilcarbamato sobre aproximadamente el 10 % de las unidades de monosacárido (MenA10/0).

40 En resumen, el oligosacárido MenA derivado de la ultrafiltración de membrana de 3 KDa descrito anteriormente se solubilizó en DMSO hasta una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml. A esta solución se le añadió un exceso molar de 20 veces de CDI (con respecto al número de moles de unidades de monosacárido de MenA) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, la solución de oligosacárido activada se añadió a continuación a 9 volúmenes de acetato de etilo frío (-20 °C) seguido de una solución 2 M de CaCl_2 hasta una concentración final equimolar con las unidades de monosacárido MenA. La mezcla se agitó durante 30 minutos y, después de la sedimentación del oligosacárido, la mayor parte del sobrenadante se eliminó por succión y el gránulo se recuperó por centrifugación, se lavó 3 veces con acetato de etilo y se secó al vacío.

45 Para la adición de grupos de bloqueo, el oligosacárido activado se solubilizó en DMSO hasta una concentración final de 10 mg/ml. Para obtener el oligosacárido "MenA10/0", se añadió un exceso molar de 0,1 veces (relativo al número de moles de unidades de monosacárido MenA) de APD, y la reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se añadieron diecinueve volúmenes de tampón de fosfato sódico 0,25 M, pH 6,5, bajo agitación. Cualquier opalescencia formada durante esta operación se eliminó por filtración a través de una membrana de 0,2 μm . Para obtener el oligosacárido "MenA10/90", se añadió un exceso molar de 0,6 veces de trietilamina y un exceso molar de 0,1 veces de APD y la reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió un exceso molar de 50 veces (en relación con el número de moles de unidades de monosacárido MenA) de ETA y la reacción continuó en agitación durante 2 horas más. Una vez más, después de este tiempo, se añadieron diecinueve volúmenes de tampón de fosfato sódico 0,25 M, pH 6,5 en agitación y se eliminó cualquier opalescencia por filtración a través de una membrana de 0,2 μm .

Las soluciones en bruto de oligosacárido derivatizado se purificaron a partir del exceso de reactivos de bajo peso

molecular por ultrafiltración en una membrana de 3 KDa. Las soluciones se concentraron en primer lugar aproximadamente 20 veces y después se diafiltraron frente a 10 volúmenes de tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,2, seguido de 10 volúmenes de agua destilada. Los productos purificados se recuperaron de las fracciones retenidas, descartándose los permeados.

5 Confirmación de modificaciones químicas por ¹H RMN

Los oligosacáridos MenA modificados químicamente se caracterizaron por RMN para confirmar que se habían producido las modificaciones químicas deseadas.

El espectro ¹H RMN del oligosacárido MenA nativo se muestra en la figura 3, panel A. El espectro es según las referencias publicadas [262, 263]. ¹H RMN realizada en APD puro y ETA dio las siguientes señales: Señales APD: HOCH₂^ACH^B(OH) CH₂^CCH₂^DCH^ENH₂ (H^A a 3,6 ppm, H^B a 3,7 ppm, H^C a 1,5 ppm, H^D a 1,6 ppm, H^E a 2,7 ppm); Señales ETA: HOCH₂^FCH₂^GNH₂ (H^F a 4,4 ppm, H^G a 3,6 ppm). Estas asignaciones se utilizaron como una guía para identificar las señales APD y ETA en los espectros de los oligosacáridos derivatizados. El espectro ¹H RMN del oligosacárido MenA10/90 se indica en la figura 3, panel B. El espectro ¹H RMN del oligosacárido MenA10/0 se indica en la figura 3, panel C. El enlace covalente entre los grupos ETA o APD y los grupos carbonilo introducidos en la posición 4 y/o 3 de N-acetilmanosamina se confirmó mediante la correlación heteronuclear (¹H, ¹³C) detectada en los espectros HSQC. Se detectaron picos de correlación de largo alcance entre los grupos carbonilo y el H^G de ETA o H^E de APD. De forma similar, los grupos carbonilo dieron una correlación de largo alcance con los protones geminales en la posición 3/4 de N-acetilmanosamina. Los porcentajes de grupos APD introducidos por el tratamiento químico se estimaron mediante la integración de señales seleccionadas procedentes de APD y MenA. Las señales superpuestas de H^D+H^C a 1,5 ppm (grupos APD) se integraron frente al pico H₂ a 4,6 ppm (oligosacárido MenA). En diferentes experimentos se sustituyeron del 6 % al 14 % de unidades de monosacárido MenA con grupos APD. Siguiendo el mismo enfoque, Los grupos ETA se estimaron por la relación con H^F señales solapadas a 3,6 ppm (grupos ETA) contra el pico H₂ a 4,6 ppm (oligosacárido MenA). Debido al solapamiento parcial con las señales APD (H^A a 3,6 ppm y H^B a 3,7 ppm), la integral de H^F se restó por el 1/4 del valor de H^D+H^C. En diferentes experimentos se sustituyeron del 66 % al 85 % de unidades de monosacárido MenA con grupos ETA. Como se esperaba, en la figura 3, no están presentes las señales del panel C relacionadas con los grupos ETA, lo que confirma la estructura propuesta y la idoneidad de la RMN como herramienta para la elucidación de la estructura y la evaluación de la identidad. La figura 3, el panel A indica que la O-acetilación se conserva después de la hidrólisis ácida del polisacárido meningocócico del serogrupo A y, aunque los grupos carbamato cambian el campo magnético local y hacen la asignación más complicada, el estado de O-acetilación parece mantenerse después de la modificación química (figura 3, paneles B y C).

Estabilidad de los oligosacáridos MenA

La degradación del oligosacárido MenA, una consecuencia de la hidrólisis en enlaces fosfodiéster, da lugar a grupos fosfomonoéster recién formados. La estabilidad de los oligosacáridos MenA10/90 y MenA 10/0 se comparó con la estabilidad de un oligosacárido nativo.

En resumen, las soluciones de los oligosacáridos MenA, en un intervalo de concentración de 1,4 a 3 mg/ml, se incubaron a 37 °C en tampón de histidina 10 mM, pH 7,2. En diferentes puntos de tiempo durante un periodo de 42 días, se analizaron los oligosacáridos para determinar la cantidad de fosfomonoéster generada durante el almacenamiento.

La figura 4 muestra el aumento de grupos fosfomonoéster durante el almacenamiento a 37 °C para los tres oligosacáridos mencionados anteriormente. El porcentaje de fosfomonoéster se calculó como $[Pm(t)-Pm(0)] \times 100 / [(Pt(0)-Pm(0))]$, donde Pm(t) y Pt(t) son las concentraciones de grupos fosfomonoéster y fósforo total en el tiempo t; y Pm(0) y Pt(0) son las concentraciones de grupos fosfomonoéster y fósforo total en el momento 0. La concentración total de fósforo (Pt) se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito en la referencia 259 y el fosfato monoéster terminal (Pm) se determinó mediante la medición del fosfato inorgánico liberado por reacción enzimática con fosfatasa ácida de patata [260].

Los oligosacáridos MenA10/90 y MenA10/0 mostraron una estabilidad mejorada en comparación con el oligosacárido nativo, como se evidencia por la tendencia reducida a liberar grupos fosfomonoéster a lo largo del tiempo. Estos resultados muestran que la estabilidad del oligosacárido MenA puede mejorarse bloqueando los grupos hidroxilo en las posiciones 4 y 3 de N-acetilmanosamina con un grupo de bloqueo de acuerdo con la presente invención.

De forma similar, se utilizó el análisis de ³¹P RMN [264] para evaluar la estabilidad de los oligosacáridos MenA modificados en comparación con el oligosacárido nativo a 37 °C durante 42 días en tampón de histidina 10 mM pH 7,2. En resumen, el grado medio de despolimerización (avDP) se determinó por la relación molar entre el fosfodiéster en los grupos de cadena (P_{en cadena}) y los grupos finales no reductores de fosfomonoéster (P_{extremo no red.}) (figura 5).

$$avDP = [P_{en\ cadena} + 1] / P_{extremo\ no\ red.}$$

Una vez más, los oligosacáridos MenA10/90 y MenA10/0 mostraron una estabilidad mejorada en comparación con el oligosacárido nativo, como se evidencia por el mayor grado de polimerización en todos los puntos temporales (figura 6).

Tabla I

Muestra	avDP						
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
Oligo MenA Nativo	19,2	17,5	17,1	14,7	13,8	12,8	11,5
Oligo MenA10/0	24,9	23,8	22,6	20,5	19,1	18,2	16,8
Oligo MenA10/90	24,3	24,3	24,1	23,5	23,5	23,6	23,1

5 **Conjugados CRM₁₉₇-MenA**

Generación de grupos aldehídicos reactivos por oxidación de peryodato controlada

Los grupos hidroxilo adyacentes de los grupos de bloqueo de 4,5-dihidroxipentilcarbamato derivados de APD en los oligosacáridos MenA10/90 y MenA10/0 se oxidaron mediante tratamiento con peryodato sódico limitado para generar grupos aldehídicos reactivos. En resumen, se hicieron reaccionar soluciones de oligosacáridos MenA10/90 y MenA10/0 en tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,2, con 0,1 moles de NaIO₄ por mol de unidades de monosacárido MenA. Las reacciones se realizaron en la oscuridad con agitación, y se monitorizaron espectrofotométricamente a 225 nm. Después de aproximadamente 2 horas, la absorbancia de 225 nm alcanzó una meseta. La cantidad de grupos aldehídicos generados por la reacción se determinó analizando la cantidad equimolar de formaldehído liberada durante la oxidación [265]. Las reacciones se detuvieron por adición de etilenglicol a una concentración final equimolar con NaIO₄.

La generación de grupos aldehídicos fue casi cuantitativa en comparación con el número inicial de grupos de bloqueo de 4,5-dihidroxipentilcarbamato.

Purificación de oligosacáridos oxidados

Los oligosacáridos oxidados se purificaron por ultrafiltración sobre una membrana de 3 KDa. Las soluciones se concentraron 2 veces y luego se diafiltraron frente a 10 volúmenes de NaCl 0,5 M seguido de 10 volúmenes de agua destilada. Se recogió la fracción retenida, que contenía el producto deseado, y se desechó el permeado. Se eliminó el agua del material retenido por evaporación rotatoria.

Conjugación con CRM₁₉₇

Los oligosacáridos MenA oxidados se conjugaron con CRM₁₉₇, un mutante no tóxico de la toxina de difteria [266], a través de aminación reductora para obtener CRM-MenA10/90 y CRM-MenA10/0 respectivamente (figura 1).

En resumen, los oligosacáridos MenA oxidados se solubilizaron en una solución de 50 mg/ml de CRM₁₉₇ a una relación de 13 moles de grupos aldehídicos por mol de proteína. Se añadió tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,2, para obtener una concentración de proteína final de 30 mg/ml. Después, se añadió una solución 2 M de NaBH₃CN en tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,2, para obtener un exceso molar de 70 veces de NaBH₃CN con respecto a los grupos aldehídicos. Las reacciones se realizaron durante 3 días a 37 °C. Después, se añadieron catorce volúmenes de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,2 seguido de un exceso molar de 25 veces de NaBH₄ (con respecto al relativo al número de moles de grupos aldehídicos). El pH se controló a 8,5 y la mezclas se agitaron durante 2 h a temperatura ambiente para inactivar cualquier grupo aldehídico residual. Al final de la etapa de inactivación, el pH se corrigió de nuevo a 7,2, y las soluciones se filtraron a través de una membrana de poro de 0,2 µm.

Purificación de conjugados

Los conjugados se purificaron del exceso de reactivos y oligosacáridos sin reaccionar residuales por ultrafiltración en una membrana de 30 KDa. Las mezclas de reacción se diafiltraron contra 100 volúmenes de tampón fosfato sódico 0,01 M, pH 7,2, seguido de 50 volúmenes de histidina 10 mM, pH 7,2. Las soluciones que contenían los conjugados purificados se filtraron entonces a través de una membrana de poro de 0,2 µm y se almacenaron a 2-8 °C.

Confirmación de conjugación con CRM₁₉₇

La conjugación de los oligosacáridos MenA con CRM₁₉₇ se demostró por SDS-Page (figura 7). SDS-Page se realizó de acuerdo con la referencia 267 usando acrilamida al 7,5 % para la apilación y acrilamida al 7,5 % para el gel de separación. Antes de la electroforesis, las muestras se trataron 1:4 con tampón de muestra y se hirvieron durante 10 min. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V de tensión constante durante aproximadamente 40 min. Los geles se

desarrollaron con una solución de tinción de Coomassie durante aproximadamente 20 minutos y se desnaturalizaron en solución de ácido acético/EtOH (7/40 %) durante aproximadamente 4 horas.

5 El perfil de los conjugados en la figura 7 se desplaza hacia pesos moleculares más altos comparados con CRM₁₉₇, y es marcadamente diferente de CRM₁₉₇. El análisis SDS-Page también demuestra la presencia de material de alto peso molecular. Este material puede formarse durante la reacción de conjugación, lo que permite múltiples puntos de unión de CRM₁₉₇ por molécula de oligosacárido.

Los conjugados también se analizaron en cuanto al contenido de sacáridos y proteínas. Se observaron relaciones de sacárido/proteína que oscilaban entre 0,20 y 0,32 (peso/peso).

Estabilidad de los conjugados CRM₁₉₇-MenA

10 La estabilidad de los conjugados CRM₁₉₇-MenA se determinó midiendo la liberación de sacárido no conjugado en el tiempo, que es resultado de la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster.

15 Los dispositivos Centricon 30 (capacidad de 2 ml) se acondicionaron por aclarado con 1 ml de agua destilada y centrifugando dos veces. Se añadieron 60 µl de solución salina a 940 µl de muestra (CRM-MenA10/90 o CRM-MenA10/0) que contenía aproximadamente 0,3 mg/ml de sacárido. El contenido total de fósforo se midió como se ha descrito anteriormente antes de añadir las mezclas a los dispositivos. Los dispositivos se centrifugaron a 1942 g hasta que se dejaron 100-200 µl de solución en la cámara de retención y después se lavaron con 2 x 1 ml de solución salina y se centrifugaron de nuevo. La solución en la cámara de permeado se recuperó y el volumen de la muestra se ajustó con solución salina a 3 ml. El permeado derivado de cada muestra se analizó para determinar el contenido de fósforo total como se describió anteriormente.

20 El valor $(P2/P1) \times 100$, donde P1 es el fósforo total antes del tratamiento con centricon y P2 es el fósforo total después del tratamiento con centricon, representa el porcentaje de sacárido libre. Experimentos de muestras enriquecidas para demostrar la recuperación del oligosacárido libre a través de la membrana se llevaron a cabo añadiendo 60 µl de aproximadamente 2 mg/ml de oligosacárido a 940 µl de muestra o solución salina y aplicando después el procedimiento de separación descrito anteriormente. La recuperación fue consistentemente superior al 80 %.

La figura 8 muestra que el conjugado CRM-MenA10/90 mostró una tendencia reducida a liberar sacárido libre en comparación con CRM-MenA10/0. FS (sacárido libre) se calcula como % de FS (t) - % de FS (0) donde % de FS (t) y % de FS (0) son los porcentajes de sacáridos libres en el momento t y 0 respectivamente.

30 La estabilidad de los conjugados CRM₁₉₇-MenA también se determinó midiendo la generación de fosfomonoéster durante el almacenamiento. En resumen, las soluciones de los conjugados, en un intervalo de concentración de 157 a 253 µg/ml, se incubaron a 37 °C en tampón de histidina 10 mM, pH 7,2. En diferentes puntos de tiempo durante un periodo de 42 días, los conjugados se analizaron para determinar la cantidad de fosfomonoéster generada durante el almacenamiento.

35 La figura 9 muestra el aumento de grupos fosfomonoéster durante el almacenamiento a 37 °C para los dos conjugados mencionados anteriormente. El porcentaje de fosfomonoéster se calculó como se ha descrito anteriormente. El conjugado CRM-MenA 10/90 mostró una tendencia reducida a generar fosfomonoéster en comparación con CRM-MenA10/0.

Immunogenicidad de los conjugados CRM-MenA

40 Con el fin de evaluar la capacidad de los conjugados MenA para obtener anticuerpos que reconocen el polisacárido capsular nativo MenA, se llevaron a cabo experimentos de inmunogenicidad en ratones.

Formulación de la vacuna

45 Los conjugados CRM-MenA10/90 y CRM MenA 10/0 se mezclaron con tampón de fosfato de sodio y una suspensión de AlPO₄ para obtener concentraciones finales de 20 µg/ml de sacárido y 0,6 mg/ml de Al³⁺ en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,2. Para las formulaciones no adyuvadas, la suspensión de AlPO₄ se reemplazó con tampón de fosfato sódico. Antes de la inmunización, las vacunas resultantes se diluyeron 1:5 con una solución salina.

Inmunización de ratones

50 Se inmunizaron grupos de 8 ratones Balb/c, hembras de 6-8 semanas, dos o tres veces s.c. con 0,5 ml de vacunas conjugadas que contenían 2 µg de sacárido. En el caso del programa de dos inyecciones, el intervalo entre la primera y la segunda dosis fue de cuatro semanas. Las extracciones de sangre se realizaron antes de la inmunización y dos semanas después de la segunda dosis. En el caso del esquema de tres dosis, las vacunas se administraron los días 0, 14 y 28 y se realizaron extracciones de sangre en el momento cero, un día antes (después de 2 dosis de suero) y 14 días después (después de 3 dosis) de la tercera inmunización.

Inmunogenicidad

Los sueros de los ratones inmunizados se analizaron para detectar anticuerpos IgG totales de polisacáridos capsulares anti-MenA específicos y para determinar la actividad bactericida en suero mediada por complemento (SBA) contra el serogrupo A de *Neisseria meningitidis*.

- 5 Se determinaron anticuerpos IgG totales de polisacáridos capsulares anti-MenA específicos esencialmente de acuerdo con el procedimiento de la referencia 268, adaptado para el análisis de sueros animales. Cada suero de ratón individual se analizó por duplicado mediante una curva de titulación. Los títulos de polisacárido anti-MenA se calcularon como Unidad de Elisa de Ratón (MEU)/ml usando un software basado en el Procedimiento de Ensayo de Línea de Referencia. Se calcularon los títulos geométricos medios (GMT) para cada grupo de inmunización.
- 10 Se midió SBA en las agrupaciones de suero post II y post III (cuando fue apropiado) para cada grupo de inmunización. El protocolo estándar de SBA se basó en el inóculo de la cepa bacteriana de ensayo (MenA F8238) en caldo Mueller Hinton con la adición de glucosa al 0,25 %. El cultivo bacteriano se incubó a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % y el crecimiento se detuvo cuando la bacteria alcanzó la fase exponencial temprana del crecimiento, aproximadamente 0,220-0,240 OD₆₀₀. Las bacterias se diluyeron a 10⁻⁴ con BSA al 1 % en tampón GBBS y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con CO₂ al 5 % en presencia de agrupamientos de suero inactivado por calor (30 minutos a 56 °C) y suero de bebé conejo al 25 % como fuente de complemento. Las mezclas de reacción se sembraron a continuación sobre agar de Mueller Hinton y se incubaron durante una noche a 37 °C. Los títulos bactericidas se expresaron como la dilución de suero recíproco dando un 50 % de muerte de las bacterias.
- 15 La Tabla II muestra los títulos de IgG totales de polisacárido capsular anti-MenA expresados como GMT (+/- 95 límites de confianza) según se midió por ELISA y los títulos de SBA inducidos por CRM-MenA10/90 y CRM-MenA10/0. Ambos conjugados fueron capaces de inducir en ratones anticuerpos de polisacáridos anti-MenA específicos con actividad funcional bactericida.
- 20

Tabla II

Vacuna	GMT del título ELISA post 2 (+/- 95 % de IC)	Título de SBA post 2
CRM-MenA 10/0 lote 5/ AIPO4	346 (230; 520)	>4096<8192
CRM-MenA 10/90 lote 5/AIPO4	270 (217;336)	4096

- 25 En un segundo experimento, la inmunogenicidad en ratones de CRM-MenA10/90 se ensayó con y sin AIPO₄. La inmunogenicidad del CRM-MenA10/90 se confirmó en la Tabla III, que muestra los títulos de anticuerpo IgG anti-MenA específicos inducidos después de dos y tres inmunizaciones y la actividad bactericida mediada por complemento de estos anticuerpos. Se encontró que los títulos de preinmunizaciones eran negativos (SBA <4). Estos datos sugieren que la presencia del adyuvante mejora la respuesta a anticuerpos. La inmunogenicidad observada en el conjugado es claramente una consecuencia de la conjugación química del oligosacárido con la proteína transportadora, ya que una mezcla física del oligosacárido MenA, CRM₁₉₇ y AIPO₄ no era inmunógena.
- 30

Tabla III

Vacuna	GMT del título ELISA post 2 (+/- 95 % de IC)	GMT del título ELISA post 3 (+/- 95 % de IC)	Título de SBA post 2	Título de SBA post 3
CRM-MenA10/90 lote 11 AIPO ₄	867 (585; 1285)	1299 (1008; 1675)	2048	4096
CRM-MenA 10/90 lote 11	388 (249; 604)	426 (241; 751)	1024	2048
OligoMenA10/90 lote 11+ CRM ₁₉₇ + AIPO ₄ (mezcla física de antígenos no conjugados)	2	2	<4	<4

Ejemplo 2**Modificación del polisacárido Men A**Modificación química del polisacárido MenA

- 35 Se añadieron 20 mg de polisacárido capsular nativo MenA (0,072 mmol) a 170 mg (2,5 mmol) de imidazol y 1 ml de CH₃CN. En agitación con una barra magnética, se añadieron 163 µl (1,59 mmol) de anhídrido acético y la reacción se incubó a 55 °C durante 21 h. La relación molar de imidazol:anhídrido acético fue de 2:4. Se utilizó una etapa de diafiltración usando una membrana de celulosa Centricon (corte de peso molecular de 1 kDa) contra agua Milli-Q (1:7 vol/vol) para purificar el producto de reacción. El material se secó finalmente al vacío (SpeedVac).
- 40 Conformación de modificaciones químicas por ¹H y ¹³C RMN

Para establecer el grado de acetilación, se realizó una caracterización estructural completa del polisacárido capsular MenA modificado por espectroscopia ¹H y ¹³C RMN.

Se utilizó análisis cuantitativo de RMN para cuantificar el nivel de O-acetilación de las cadenas de sacáridos. El porcentaje de O-acetilación se estimó mediante la integración del pico H₂^{30Ac} (protón en la posición C-2 de los residuos de N-acetilmanosamina O-acetilados en C-3), pico H₂^{40Ac} (protón en la posición C-2 de los residuos de N-acetilmanosamina O-acetilados en C-4) y pico H₂^{DEOAc} (protón en la posición C-2 de los residuos de N-acetilmanosamina con O-acetilación), en comparación con H₁ (protón en la posición C-1 de los residuos de N-acetilmanosamina). El nivel de O-acetilación total se obtuvo por la suma de las integraciones de los picos H₂^{30Ac} y H₂^{40Ac}.

$$\%O - Acetilación = [H_2^{30Ac} + H_2^{40Ac}] / [H_1^{OAc} + H_1^{DEOAc}]$$

Además, Además, se estimó el porcentaje de O-acetilación mediante la integración del pico H₂^{30Ac}/H₂^{40Ac} (protón en la posición C-3 de los residuos N-acetilmanosina O-acetilados en C-3 y protón en la posición C-4 de los residuos de N-acetilmanosamina O-acetilado en C-4), en comparación con H₁ (protón en la posición C-1 de los residuos de N-acetilmanosanina).

$$\%O - Acetilación = [H_2^{30Ac} + H_2^{40Ac}] / [H_1^{OAc} + H_1^{DEOAc}]$$

15 Estabilidad de los polisacáridos MenA

Se usó el análisis de ³¹P RMN para evaluar la estabilidad del polisacárido capsular MenA modificado totalmente acetilado en comparación con el polisacárido nativo y el oligosacárido correspondiente a 37 °C durante 42 días en tampón de histidina 10 mM pH 7,2, como se ha descrito anteriormente.

El polisacárido MenA modificado totalmente O-acetilado era mucho más estable que el polisacárido capsular nativo y el oligosacárido correspondiente.

Tabla IV

Muestra	avDP						
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
Poli MenA nativo	>50	>50	44,6	29,6	26,9	20,8	18,3
Oligo MenA Nativo	17,3	15,5	13,0	12,0	11,0	10,4	9,6
Poli MenA totalmente Ac	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50

Estos resultados confirman que la estabilidad del oligosacárido MenA puede mejorarse bloqueando los grupos hidroxilo en las posiciones 4 y 3 de N-acetilmanosamina con un grupo de bloqueo de acuerdo con la presente invención.

Se entenderá que la invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo y se pueden hacer modificaciones manteniéndose dentro del alcance de la invención.

Referencias

- [1] US patent 4,711,779
- [2] US patent 4,761,283
- [3] US patent 4,882,317
- [4] WO 03/080678
- [5] Berkin et al. (2002) Chemistry 8:4424-33
- [6] Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251):195-6
- [7] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36
- [8] Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-8
- [9] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-33, vii
- [10] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567
- [11] EP-B-0 477 508
- [12] US patent 5,306,492
- [13] WO98/42721
- [14] Dick et al. in Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, 48-114
- [15] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego CA (1996)
- [16] US patent 4,356,170
- [17] US patent 4,695,624
- [18] Bethell G.S. et al., J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4
- [19] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18
- [20] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919

- [21] EP-A-0208375
 [22] WO00/10599
 [23] Gever et al., *Med. Microbiol. Immunol*, 165: 171-288 (1979).
 [24] US patent 4,057,685.
 5 [25] US patents 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
 [26] US patent 4,459,286.
 [27] US patent 4,965,338
 [28] US patent 4,663,160.
 [29] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002)
 10 [30] EP-A-0372501
 [31] EP-A-0378881
 [32] EP-A-0427347
 [33] WO93/17712
 [34] WO94/03208
 15 [35] WO98/58668
 [36] EP-A-0471177
 [37] WO00/56360
 [38] WO91/01146
 [39] WO00/61761
 20 [40] WO01/72337
 [41] Lei et al. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264
 [42] WO00/38711
 [43] WO99/42130
 [44] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
 25 [45] Nony et al. (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
 [46] Greenbaum et al. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
 [47] Zurbriggen et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
 [48] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
 [49] Mann et al. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
 30 [50] Halperin et al. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
 [51] Herbert et al. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
 [52] Chen et al. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.
 [53] US patent 6355271.
 [54] WO00/23105.
 35 [55] WO01/22972.
 [56] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
 [57] WO02/26757.
 [58] WO99/62923.
 [59] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
 40 [60] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
 [61] WO98/40100.
 [62] US patent 6,207,646.
 [63] US patent 6,239,116.
 [64] US patent 6,429,199.
 45 [65] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
 [66] Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
 [67] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
 [68] WO01/95935.
 [69] Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.
 50 [70] Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.
 [71] WO03/035836.
 [72] Myers et al. (1990) pages 145-156 of *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.
 [73] Ulrich (2000) Chapter 16 (pages 273-282) of reference 132.
 [74] Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
 55 [75] Baldrick et al. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
 [76] UK patent application GB-A-2220211.
 [77] US 4,680,338.
 [78] US 4,988,815.
 [79] WO92/15582.
 60 [80] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
 [81] Wu et al. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
 [82] Vasilakos et al. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
 [83] US patents 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937,
 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264,
 65 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203,
 6888000 and 6924293.

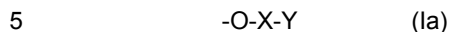
- [84] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
 [85] WO2004/060308.
 [86] WO2004/064759.
 [87] US 6,924,271.
 5 [88] US2005/0070556.
 [89] US 5,658,731.
 [90] US patent 5,011,828.
 [91] WO2004/87153.
 [92] US 6,605,617.
 10 [93] WO02/18383.
 [94] WO2004/018455.
 [95] WO03/082272.
 [96] WO2006/002422.
 [97] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
 15 [98] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
 [99] Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
 [100] Payne et al. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
 [101] US 5,057,540.
 [102] WO96/33739.
 20 [103] EP-A-0109942.
 [104] WO96/11711.
 [105] WO00/07621.
 [106] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
 [107] Sjolander et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
 25 [108] Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
 [109] WO95/17211.
 [110] WO98/42375.
 [111] Singh et al] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
 [112] WO99/27960.
 30 [113] US 6,090,406
 [114] US 5,916,588
 [115] EP-A-0626169.
 [116] WO99/52549.
 [117] WO01/21207.
 35 [118] WO01/21152.
 [119] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
 [120] WO2004/064715.
 [121] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
 [122] WO03/011223.
 40 [123] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
 [124] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
 [125] US-6586409.
 [126] Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
 [127] US2005/0215517.
 45 [128] WO90/14837.
 [129] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
 [130] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
 [131] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 50 [132] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [133] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
 [134] Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
 [135] WO95/11700.
 55 [136] US patent 6,080,725.
 [137] WO2005/097181.
 [138] International patent application WO 03/007985.
 [139] WO01/52885.
 [140] Bjune et al. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
 60 [141] Fukasawa et al. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
 [142] Rosenqvist et al. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
 [143] Covacci & Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
 [144] WO93/18150.
 [145] Covacci et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
 65 [146] Tummuru et al. (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
 [147] Marchetti et al. (1998) *Vaccine* 16:33-37.

- [148] Telford et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
 [149] Evans et al. (1995) *Gene* 153:123-127.
 [150] WO96/01272 & WO96/01273, especially SEQ ID NO:6.
 [151] WO97/25429.
 5 [152] WO98/04702.
 [153] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 [154] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
 [155] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
 [156] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
 10 [157] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
 [158] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
 [159] Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
 [160] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
 [161] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 15 [162] Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 [163] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
 [164] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
 [165] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
 [166] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
 20 [167] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
 [168] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
 [169] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
 [170] European patent 0477508.
 [171] US patent 5,306,492.
 25 [172] WO98/42721.
 [173] *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.
 [174] Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 or 012342335X.
 [175] WO02/02606.
 [176] Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
 30 [177] Read et al. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
 [178] Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
 [179] WO99/27105.
 [180] WO00/27994.
 [181] WO00/37494.
 35 [182] WO99/28475.
 [183] Ross et al. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
 [184] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
 [185] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
 [186] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
 40 [187] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
 [188] WO02/34771.
 [189] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
 [190] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 [191] Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; see also pages 1218-1219.
 45 [192] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.
 [193] Demicheli et al. (1998) *Vaccine* 16:880-884.
 [194] Stepanov et al. (1996) *J Biotechnol* 44: 155-160.
 [195] EP-A-0139417.
 [196] Harper et al. (2004) *Lancet* 364(9447):1757-65.
 50 [197] Ingram (2001) *Trends Neurosci* 24:305-307.
 [198] Rosenberg (2001) *Nature* 411:380-384.
 [199] Moingeon (2001) *Vaccine* 19:1305-1326.
 [200] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
 [201] Donnelly et al. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
 55 [202] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
 [203] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
 [204] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
 [205] Dubensky et al. (2000) *Mol Med* 6:723-732.
 [206] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
 60 [207] Donnelly et al. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S 190-193.
 [208] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
 [209] Parkhill et al. (2000) *Nature* 404:502-506.
 [210] Tettelin et al. (2000) *Science* 287:1809-1815.
 [211] WO00/66791.
 65 [212] Pizza et al. (2000) *Science* 287:1816-1820.
 [213] WO99/24578.

- 5 [214] WO99/36544.
 [215] WO99/57280.
 [216] WO00/22430.
 [217] WO00/66741.
 [218] WO01/64920.
 [219] WO01/64922.
 [220] WO03/020756.
 [221] WO2004/014419.
 [222] WO99/31132; US patent 6,495,345.
 10 [223] WO99/58683.
 [224] Peak et al. (2000) FEMS Immunol Med Microbiol 28:329-334.
 [225] WO93/06861.
 [226] EP-A-0586266.
 [227] WO92/03467.
 15 [228] US patent 5912336.
 [229] WO2004/014418.
 [230] UK patent applications 0223741.0, 0305831.0 & 0309115.4; and WO2004/032958.
 [231] Comanducci et al. (2002) J. Exp. Med. 195:1445-1454.
 [232] WO2004/048404
 20 [233] WO03/063766.
 [234] Masignani et al. (2003) J Exp Med 197:789-799.
 [235] WO2004/015099.
 [236] WO02/09643.
 [237] Katial et al. (2002) Infect. Immun. 70:702-707.
 25 [238] US patent 6,180,111.
 [239] WO01/34642.
 [240] PCT/IB2005/003494.
 [241] WO99/10497.
 [242] WO02/07763.
 30 [243] European patent 0624376.
 [244] WO01/52885.
 [245] WO00/25811.
 [246] Claassen et al. (1996) Vaccine 14:1001-1008.
 [247] Peeters et al. (1996) Vaccine 14:1009-1015.
 35 [248] WO01/09350.
 [249] WO02/09746.
 [250] Adu-Bobie et al. (2004) Infect Immun 72:1914-1919.
 [251] WO 02/062378.
 [252] WO 2004/014417.
 40 [253] Maiden et al. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
 [254] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
 [255] Pettersson et al. (1994) Microb Pathog 17(6):395-408.
 [256] Maiden et al. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
 [257] Welsch et al. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public
 45 Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. *Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains.*
 [258] Santos et al. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public
 Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. *Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel
 vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of N. meningitidis.*
 50 [259] Chen et al. (1956) Anal. Chem.28:1756-1758.
 [260] Anderson et al. (1985) J. Clin. Invest.76:52-59.
 [261] Costantino et al. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
 [262] Lemercinier and Jones (1996) Carbohydr. Res.296:83-96.
 [263] Gudlavalleti et al. (2004) J. Biol. Chem.279(41):42765-42773.
 55 [264] Berti F., Bartoloni A., Norelli F., Averani G., Giannozzi A., Berti S. and Costantino P. Congress Presentation
 - 15th International Pathogenic Neisseria Conference (2006)
 [265] Nash (1953) J. Biochem. 55:416-421.
 [266] Giannini et al. (1984) Nucleic Acids Res.12:4063-4069
 [267] Laemmli (1970) Nature, Lond. 227:680-685.
 60 [268] Carlone et al. (1992) J. Clin. Microbiol. 30:154-159.

REIVINDICACIONES

1. Un sacárido capsular modificado que comprende un grupo de bloqueo en una posición de grupo hidroxilo en al menos el 80 % de las unidades de monosacáridos del sacárido capsular nativo correspondiente, en el que el grupo de bloqueo tiene la fórmula (Ia):



en la que

X es C(O);
Y es R³; y
R³ es alquilo C₁₋₆

10 en el que el sacárido capsular nativo correspondiente comprende unidades de monosacárido unidas por enlaces fosfodiéster.

2. El sacárido capsular modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R³ es alquilo C₁₋₃.

3. El sacárido capsular modificado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que R³ es CH₃.

4. El sacárido capsular modificado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que R³ es alquilo C₂ o alquilo C₃.

15 5. El sacárido capsular modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sacárido capsular nativo correspondiente es un sacárido del serogrupo A de *Neisseria meningitidis*, particularmente en el que el grupo de bloqueo está en cualquiera de las posiciones 4 y/o 3 del sacárido del serogrupo A de *Neisseria meningitidis* correspondiente, más particularmente en el que el grupo de bloqueo está en cualquiera de las posiciones 4 del sacárido del serogrupo A de *Neisseria meningitidis* correspondiente,

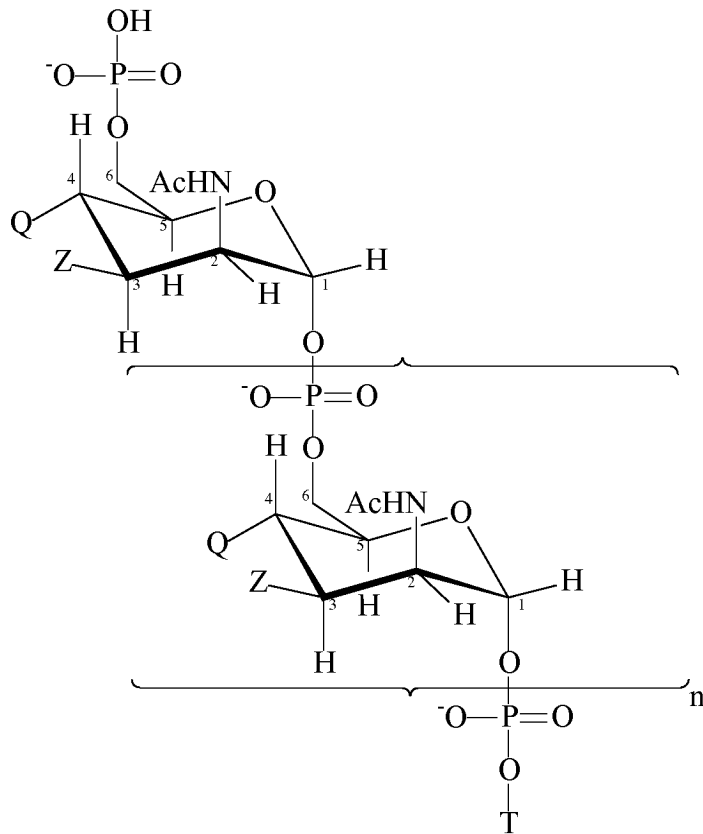
20 6. El sacárido capsular modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que todas las unidades de monosacárido del sacárido tienen grupos de bloqueo.

7. El sacárido capsular modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sacárido capsular modificado es un oligosacárido.

8. El sacárido capsular modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

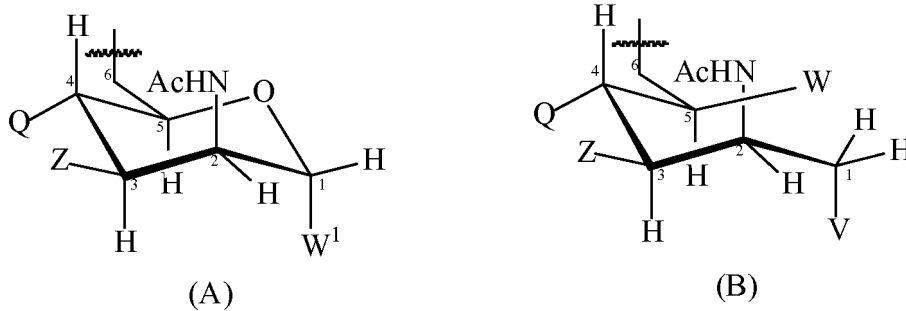
- 25 a) el sacárido modificado comprende un grupo hidroxilo anomérico terminal o un grupo amino derivado de un grupo hidroxilo anomérico terminal; o o
b) hay al menos una unidad de monosacárido del sacárido capsular modificado donde dos grupos hidroxilo adyacentes del sacárido capsular nativo correspondiente no comprenden grupos de bloqueo.

9. Un sacárido de fórmula:



en la que

T tiene la fórmula (A) o (B):

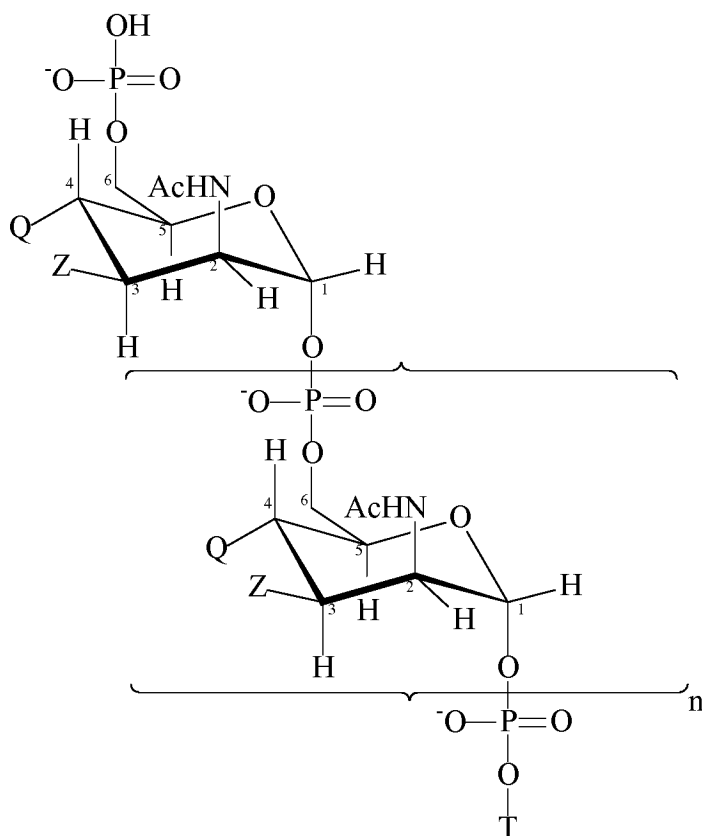


- 5 n es un número entero de 1 a 100;
 cada grupo Z se selecciona independientemente entre OH, OAc o un grupo de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1 a 4; y
 cada grupo Q se selecciona independientemente de entre OH, OAc o un grupo de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1 a 4;
- 10 V se selecciona de entre -NH₂, -NHE, -NE¹E², W², o -O-D, en la que: E, E¹ y E² son grupos protectores de nitrógeno, que pueden ser iguales o diferentes, y D es un grupo protector de oxígeno;
 W se selecciona entre -OH o un grupo de bloqueo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
 W¹ se selecciona entre -OH o un grupo de bloqueo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
- 15 W² se selecciona entre -OH o un grupo de bloqueo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;

y en las que al menos uno de los grupos Z y el 80-99 % de los grupos Q son grupos de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1 a 4, el 1-20 % de los grupos Q son OAc y el resto de los grupos Q son OH.

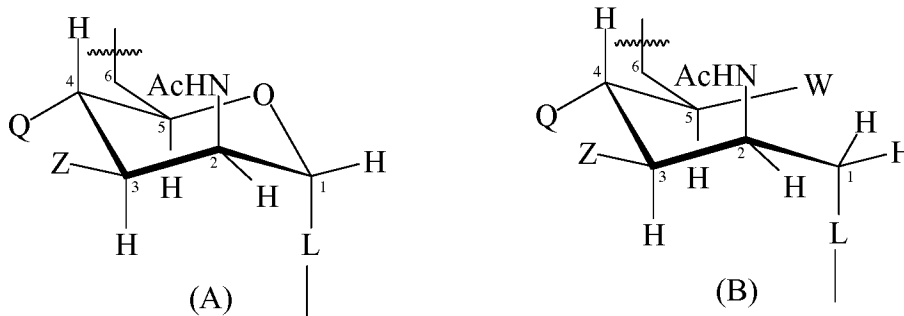
- 20 10. El sacárido de acuerdo con la reivindicación 9, en el que al menos el 10 % de los grupos Z son grupos de bloqueo y/o n es un número entero de 15 a 25.

11. Un procedimiento de modificación de un sacárido capsular que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un sacárido capsular que tiene al menos un grupo hidroxilo en una unidad de monosacárido; y
 (b) convertir dicho al menos un grupo hidroxilo en un grupo de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1 a 4 en al menos el 80 % de las unidades de monosacárido del sacárido capsular, particularmente en el que la etapa (b) comprende la etapa de:
- (b) hacer reaccionar el sacárido capsular con $[(R^3C(O))_2O$ en presencia de un catalizador de imidazol.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el sacárido capsular en la etapa (a) es un oligosacárido capsular, particularmente en el que el oligosacárido capsular se puede obtener por despolimerización y dimensionamiento del polisacárido capsular nativo correspondiente, o el sacárido capsular en la etapa (a) es un polisacárido capsular nativo y el procedimiento comprende además una etapa (c) en la que se dimensiona el producto de la etapa (b), proporcionando de este modo un oligosacárido capsular modificado.
13. Un procedimiento para modificar un polisacárido del serogrupo A de *Neisseria meningitidis* que comprende las etapas de:
- (A)
- (a) proporcionar un polisacárido del serogrupo A de *Neisseria meningitidis* nativo;
 (b) despolimerizar y dimensionar dicho polisacárido para proporcionar un oligosacárido; y
 (c) convertir al menos un grupo hidroxilo del oligosacárido en un grupo de bloqueo, de acuerdo con la reivindicación 11; o
- (B)
- (a) proporcionar un polisacárido del serogrupo A de *Neisseria meningitidis* nativo;
 (b) convertir al menos un grupo hidroxilo del polisacárido en un grupo de bloqueo, de acuerdo con la reivindicación 11; y
 (c) despolimerizar y dimensionar el polisacárido resultante.
14. Un procedimiento de preparación del sacárido capsular modificado de las reivindicaciones 1 a 10, que es un procedimiento de síntesis total que comprende formar enlaces glicosídicos entre dos o más unidades de monosacárido.
15. Un conjugado sacárido-proteína de un sacárido modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, particularmente en el que la proteína es una toxina o un toxoide bacteriano, por ejemplo, toxina diftérica o toxoide diftérico, más particularmente en el que la toxina o toxoide bacteriano es CRM₁₉₇.
16. Un procedimiento de preparación de un conjugado sacárido-proteína que comprende las etapas de:
- (A)
- (a) proporcionar un sacárido capsular modificado de acuerdo con la reivindicación 8, parte a); y
 (b) conjugar el sacárido capsular modificado en una proteína a través del grupo hidroxilo anomérico terminal o el grupo amino derivado de un grupo hidroxilo anomérico terminal; o
- (B)
- (a) proporcionar un sacárido capsular modificado de acuerdo con la reivindicación 8, parte b);
 (b) convertir al menos uno de los pares de grupos hidroxilo adyacentes en grupos aldehído por escisión oxidativa; y
 (c) unir el sacárido capsular modificado a una proteína por aminación reductora.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la proteína es como se define en la reivindicación 15.
18. Una molécula que comprende un resto de sacárido de fórmula:



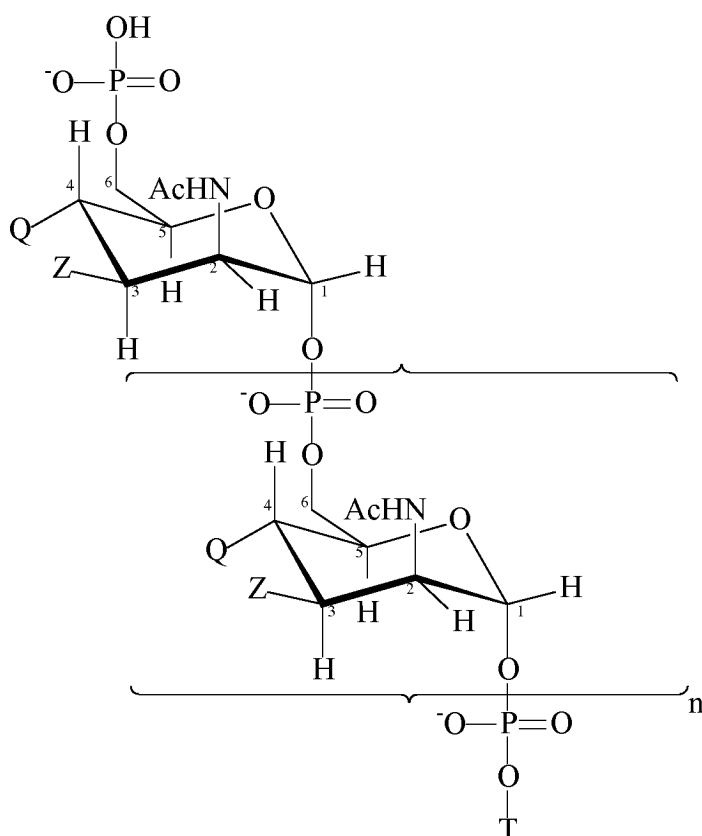
en la que

T tiene la fórmula (A) o (B):



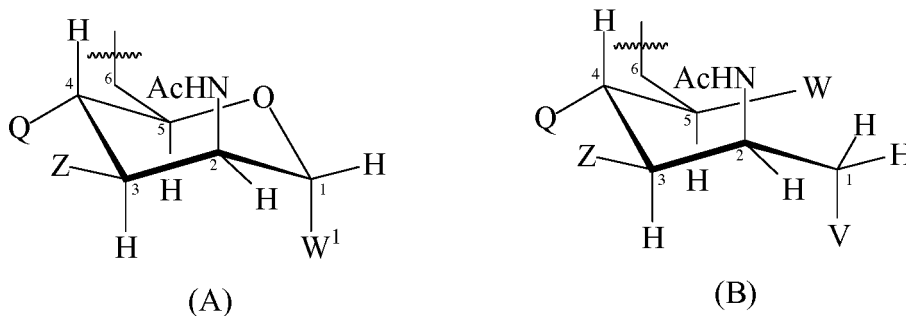
- 5 n es un número entero de 1 a 100;
 cada grupo Z se selecciona independientemente de OH o un grupo de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1 a 4; y
 cada grupo Q se selecciona independientemente de OH o un grupo de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1 a 4;
- 10 W se selecciona entre OH o un grupo de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1 a 4;
 L es O, NH, NE, S o Se;
 en las que el enlace covalente libre de L está unido a un transportador proteico;
 en las que el transportador proteico es como se define en la reivindicación 15;
- 15 y en las que al menos uno de los grupos Z y el 80-99 % de los grupos Q son grupos de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1 a 4, el 1-20 % de los grupos Q son OAc y el resto de los grupos Q son OH.

19. Una molécula que comprende un sacárido de fórmula:

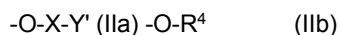


en la que

T tiene la fórmula (A) o (B):



5 n, Z, Q, W, W¹ y V son como se define en la reivindicación 9, y al menos uno de los grupos Z y/o al menos uno de los grupos Q tienen la fórmula (IIa) o (IIb):



en la que

10 X es C(O), S(O) o SO₂;
 Y' es NR²R⁴;
 R² es H o alquilo C₁-₆; y
 R⁴ es -alquileo C₁-₄-CH(O) o -alquileo C₁-₅-NH-, en la que el grupo -NH- es parte de un transportador proteico;

15 en la que el transportador proteico es una proteína definida en la reivindicación 15 y en la que al menos el 80 % de las unidades de monosacárido del sacárido tienen grupos de bloqueo como se define en las reivindicaciones 1-4.

20. Una composición farmacéutica que comprende (a) un sacárido modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y/o un conjugado sacárido-proteína de acuerdo con la reivindicación 15, y/o una molécula de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, particularmente que

comprende además un antígeno de sacárido de uno o más de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*, siendo el sacárido opcionalmente un oligosacárido y estando conjugado opcionalmente con una proteína transportadora, y/o que comprende además un adyuvante de vacuna tal como un fosfato de aluminio.

5 21. La composición de acuerdo con la reivindicación 20, que es una vacuna contra una enfermedad causada por *N. meningitidis*.

22. El sacárido modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; el conjugado de acuerdo con la reivindicación 15; o la molécula de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, para su uso como un medicamento, particularmente para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad causada por una o más bacterias encapsuladas, más particularmente en el que la enfermedad es meningitis bacteriana.

10

Figura 1

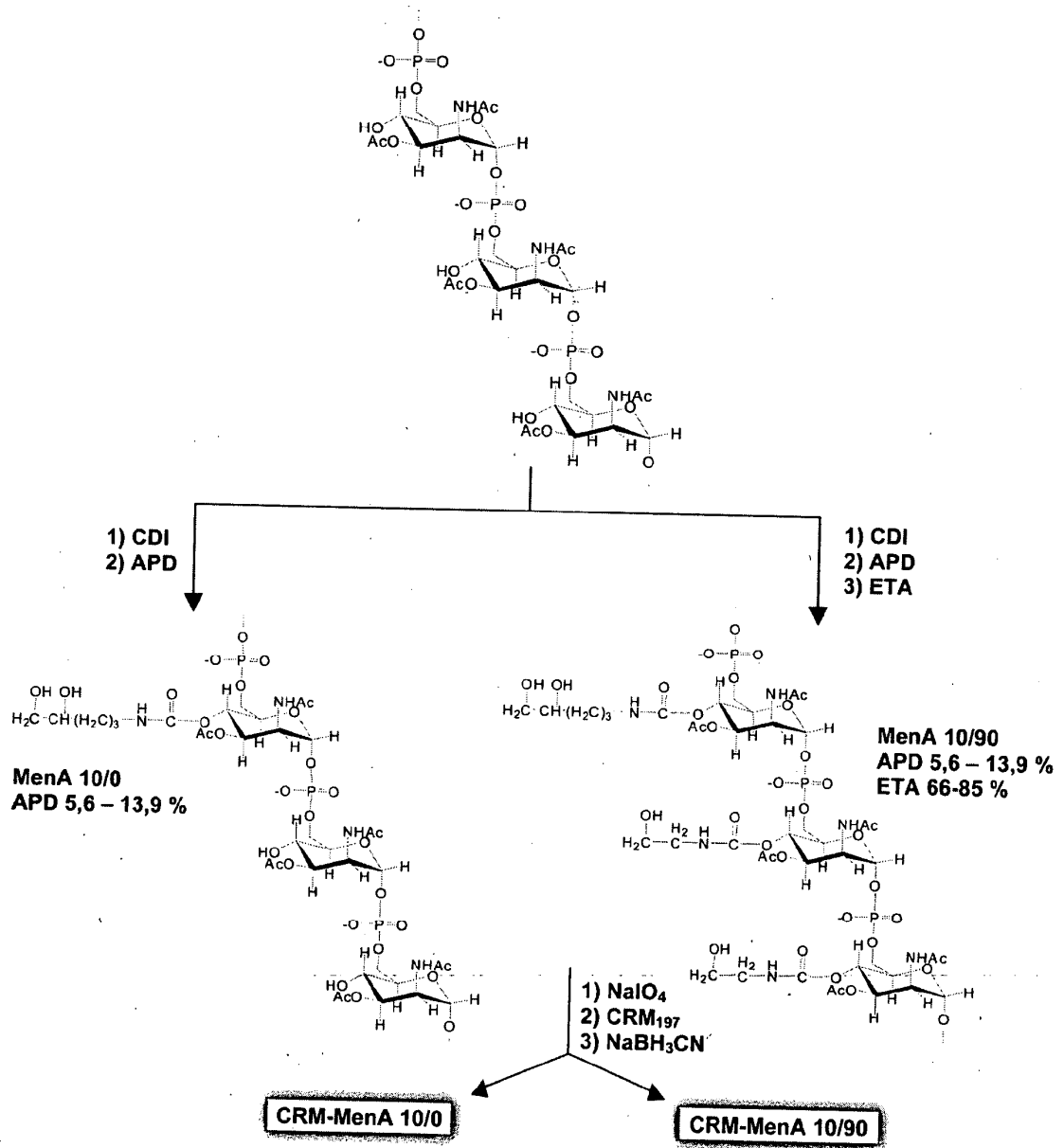


Figura 2

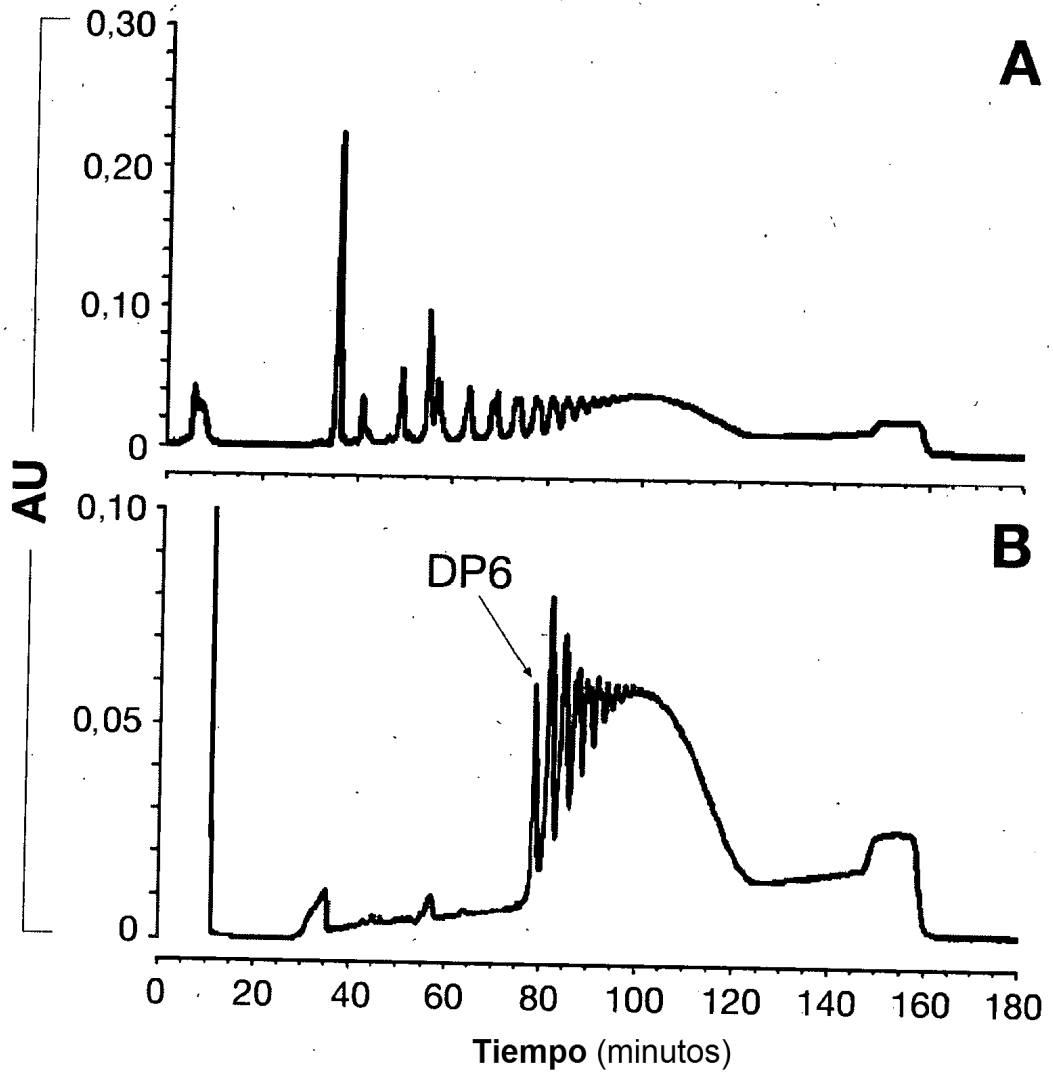


Figura 3

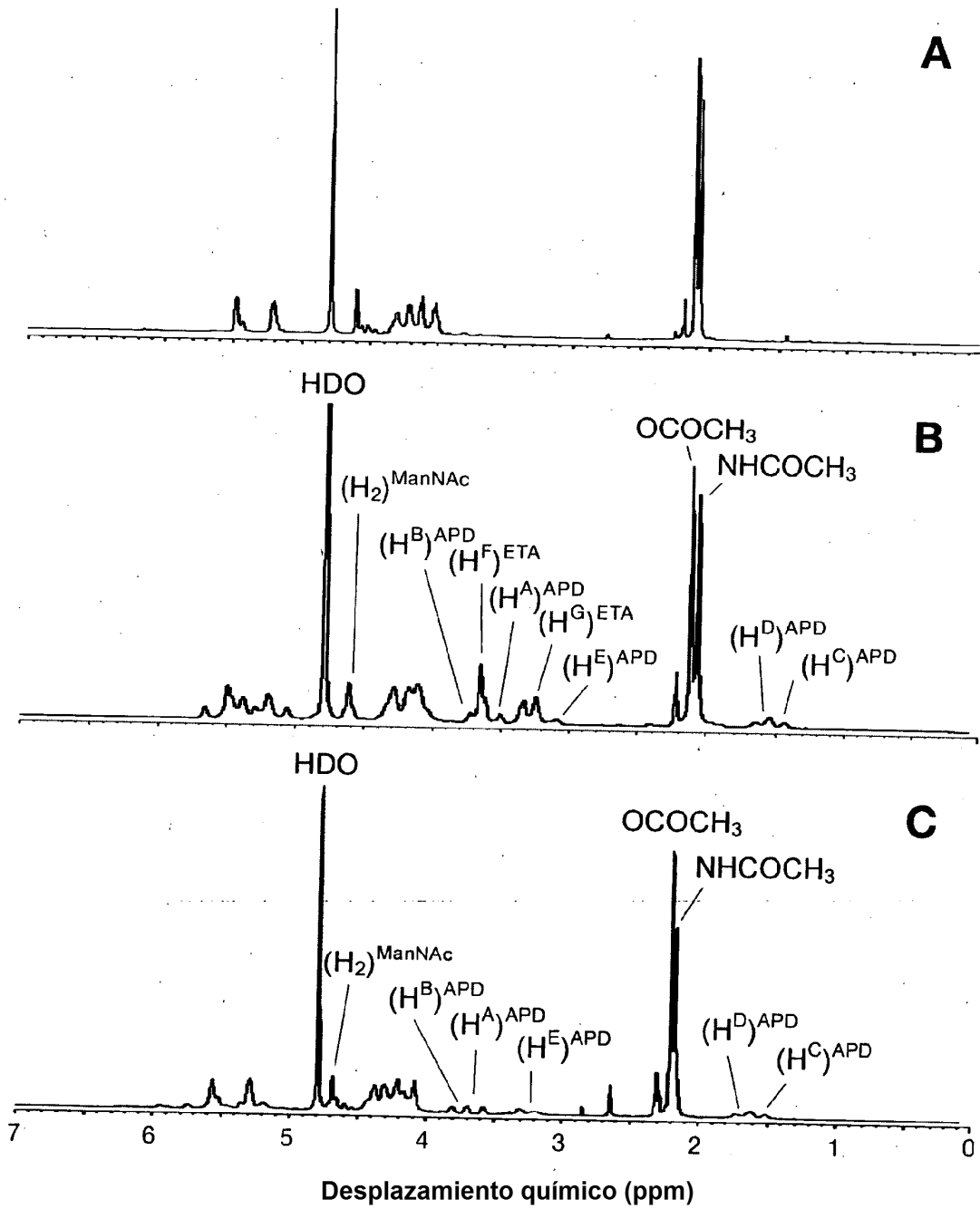


Figura 4

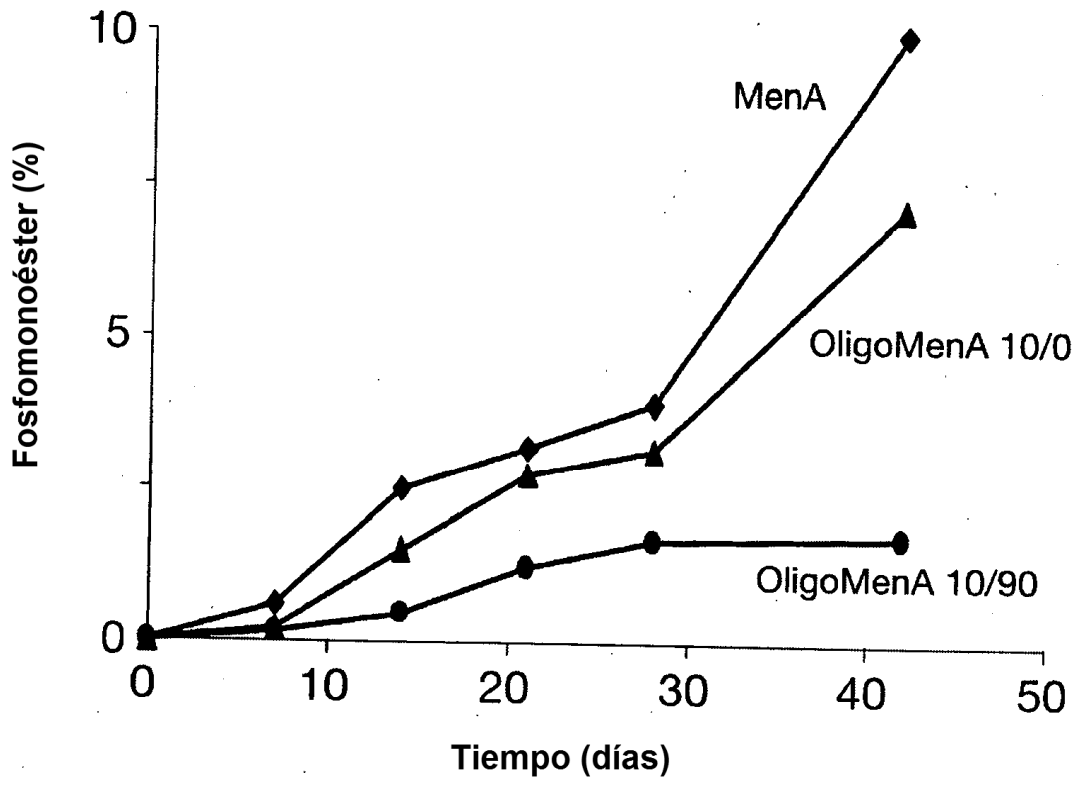


Figura 5

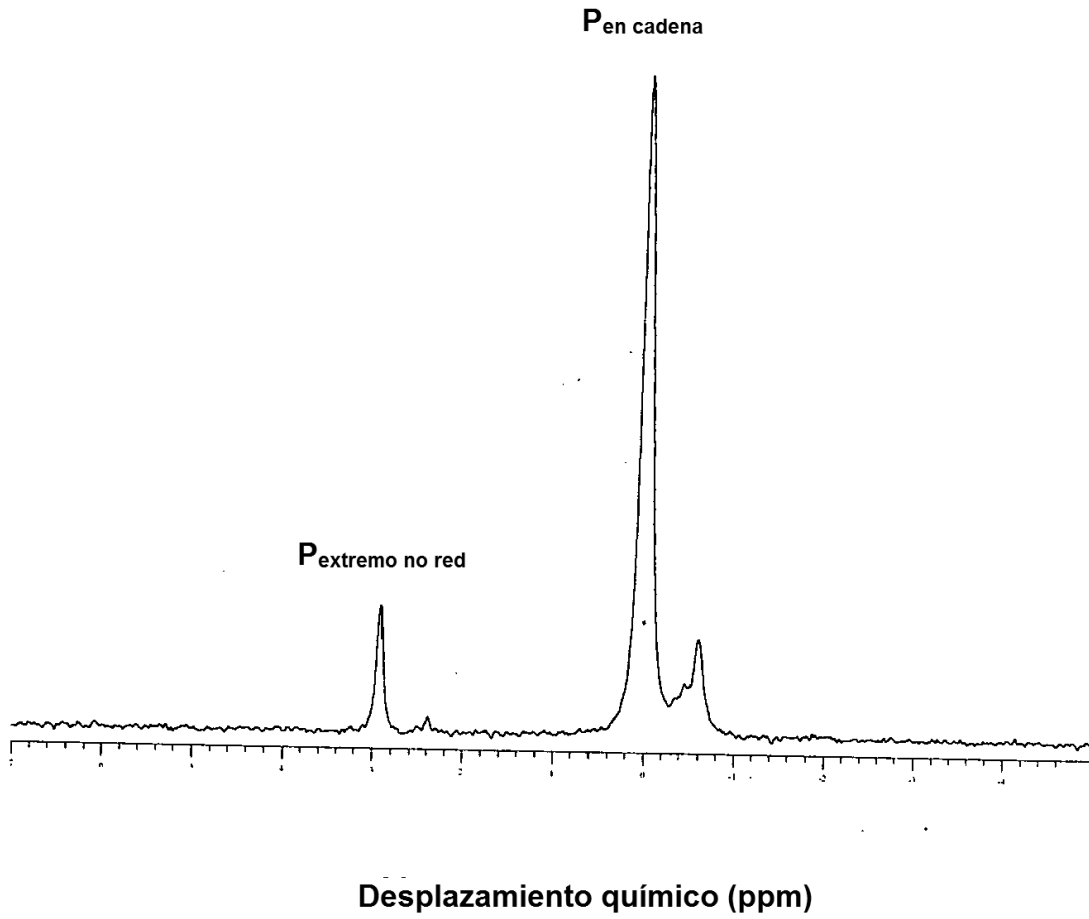


Figura 6

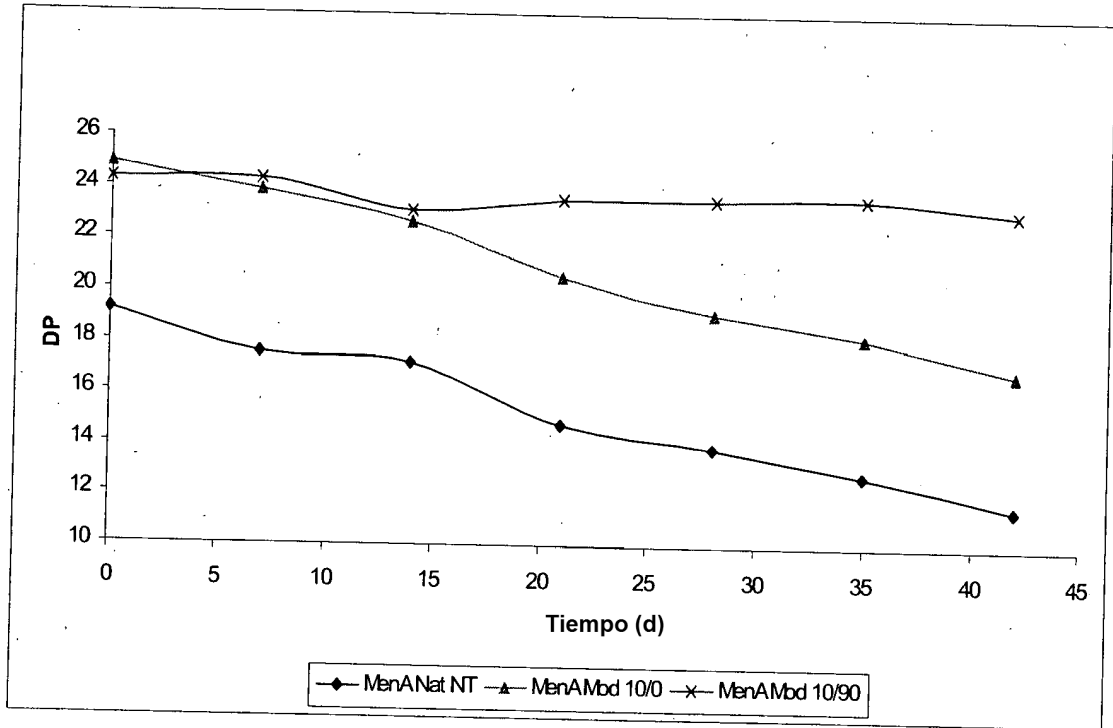


Figura 7

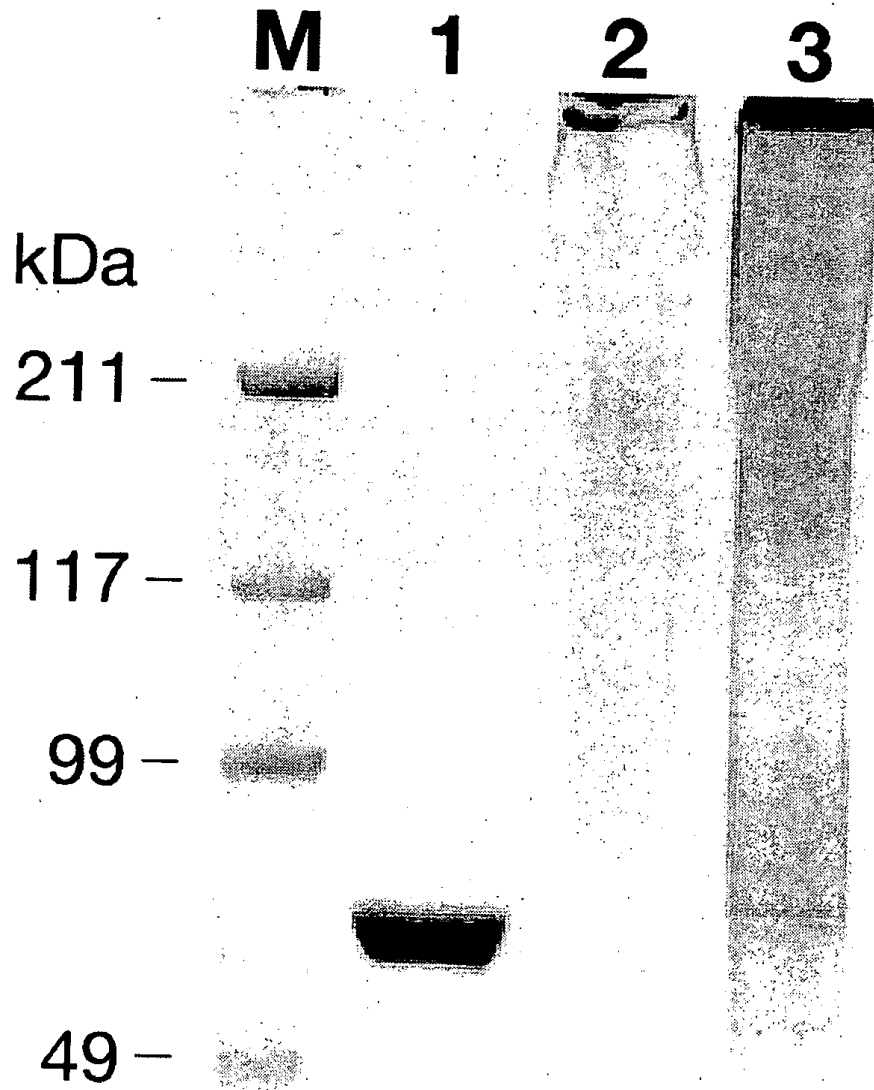


Figura 8

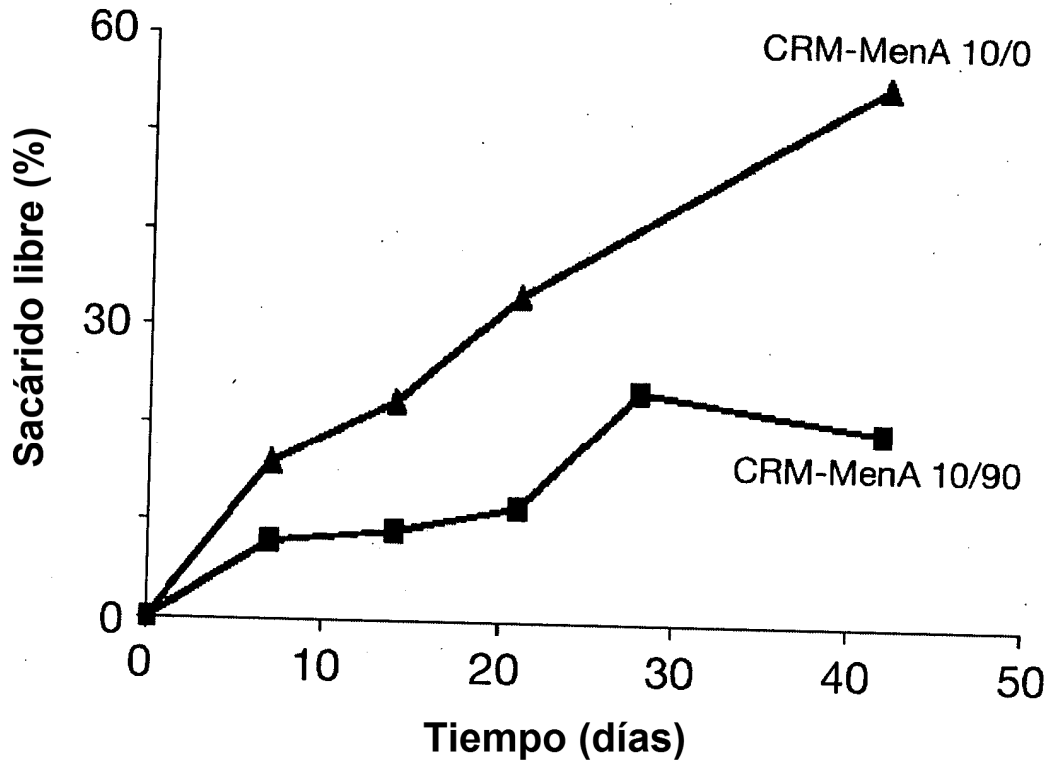


Figura 9

