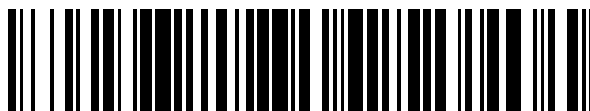


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 594**

51 Int. Cl.:

C07D 207/46 (2006.01)

C07C 327/20 (2006.01)

C07C 327/32 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2009** **PCT/US2009/004206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2010** **WO10011284**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2009** **E 09800657 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017** **EP 2315747**

54 Título: **Métodos y composiciones relacionados con oligosacáridos sintéticos de beta-1,6 glucosamina**

30 Prioridad:

21.07.2008 US 135493 P

20.02.2009 US 208155 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2018

73 Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.

(100.0%)

75 Francis Street

Boston, MA 02115, US

72 Inventor/es:

PIER, GERALD, B.;

NIFANTIEV, NIKOLAY;

TSVETKOV, YURY y

GENING, MARINA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 660 594 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

Métodos y composiciones relacionados con oligosacáridos sintéticos de beta-1,6 glucosamina

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes provisionales de Estados Unidos 61/135493 y 61/208155, presentadas el 21 de julio de 2008 y el 20 de febrero de 2009, respectivamente, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia.

10 FINANCIACIÓN GUBERNAMENTAL

La presente invención está financiada en parte por la beca RO1AI046706 de los National Institutes of Health estadounidenses. El gobierno estadounidense tiene algunos derechos sobre la presente invención.

15 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones y métodos relacionados con los oligo- β -(1 $\rightarrow$ 6)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosidos sintéticos que se denominan en el presente documento, de forma indistinta, como oligo- β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucosaminas u oligoglucosaminas.

Antecedentes de la invención

Los *Staphylococci* son bacterias gram positivas que normalmente habitan y colonizar la piel y las membranas mucosas de los seres humanos. Si la piel o la membrana mucosa resulta dañada durante una intervención quirúrgica u otro traumatismo, los *Staphylococci* pueden acceder a los tejidos internos, produciendo el desarrollo de una infección. Si los *Staphylococci* proliferan localmente o se introducen en la sangre o el sistema linfático, se pueden producir complicaciones infecciosas graves tales como las asociadas a bacteremia *Staphylococcal*. Estas complicaciones incluyen choque séptico, endocarditis, artritis, osteomielitis, neumonía, y abscesos en varios órganos.

Los *Staphylococci* incluyen tantos organismos coagulasa-positivos, que producen una coagulasa libre, y organismos coagulasa negativos, que no producen esta coagulasa libre. *Staphylococcus aureus* es la forma coagulasa-positiva de *Staphylococci*. *S. aureus* produce generalmente infecciones locales, tanto extravasculares como intravasculares, que finalmente dan como resultado la bacteremia. *S. aureus* es también la causa principal de la osteomielitis aguda, y produce infecciones de neumonía *Staphylococcal*. De manera adicional, *S. aureus* es responsable de aproximadamente 1-9% de los casos de meningitis bacteriana y del 10-15% de abscesos cerebrales.

Existen al menos treinta y una especies conocidas de *Staphylococci* coagulasa negativos, entre los que se incluyen *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. saprophiticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. simulans*, y *S. capitis*. *S. epidermidis* es el agente causante de infecciones más frecuente asociado con los dispositivos de acceso intravenoso, y el aislado más frecuente en bacteremias intrahospitalarias primarias. *S. epidermidis* también está asociado con la endocarditis por válvula protésica.

Staphylococcus es también una fuente habitual de infecciones bacterianas en animales. Por ejemplo, la mastitis *Staphylococcal* es un problema habitual en rumiantes tales como ganado bobino, ovejas y cabras. La enfermedad se trata generalmente con antibióticos para reducir la infección pero el tratamiento es un procedimiento caro y sigue dando como resultado una pérdida en la producción de leche. Las vacunas más eficaces identificadas hasta la fecha son vacunas de *S. aureus* intacto vivo administradas por vía subcutánea. La administración de vacunas vivas, sin embargo, está asociada con el riesgo de infección. Por esa razón, muchos investigadores han intentado producir vacunas de *S. aureus* muertos y/o asilar polisacáridos capsulares o componentes de la pared celular que inducirán inmunidad frente al *S. aureus*.

Los compuestos vehículo se utilizan en ocasiones en vacunas para potenciar la respuesta inmunitaria contra el antígeno. Por ejemplo, en algunas vacunas, el vehículo es útil para estimular los linfocitos T auxiliares en respuesta al resto antigénico. Los restos antigénicos que se producen naturalmente o fragmentos de sustancias naturales frecuentemente son menos accesibles y menos fácilmente manipulables y/o conjugables con otros restos tales como por ejemplo compuestos vehículo, y esto puede reducir el impacto terapéutico de estas vacunas.

El documento WO 98/47915 se refiere a conjugados de poliamida que comprenden bien (a) un grupo xenoantigénico; o (b) un grupo biológicamente activo y una entidad macromolecular, macroscópica o microscópica, unida a una estructura de poliamida.

El documento WO 97/19105 se refiere a polipéptidos biológicamente degradables que tienen átomos de halógeno activos que están unidos covalentemente a cadenas secundarias, y usos de los mismos.

Thoma G et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2002, 41 N.º 17, p3195-3198 se refiere a glicodendrimeros que se autoensamblan para formar nanopartículas que funcionan como ligandos polivalentes *in vitro* e *in vivo*.

Thoma G et al., J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 7414-7415 se refiere a la síntesis de conjugados de oligosacárido-polilisina.

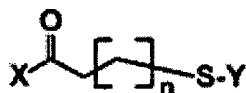
Sumario de la invención

La presente invención proporciona un compuesto; composición; conjugado de oligosacárido-vehículo; y un método y la materia sujeto de la invención se define en una o más de las reivindicaciones 1 a 18 adjuntas.

La invención proporciona métodos y compuestos novedosos para generar composiciones antigénicas tales como, aunque no de forma limitativa, vacunas. En particular, la invención proporciona métodos novedosos para modificar antígenos de oligosacárido. Estos métodos implican la síntesis controlada de oligosacárido (a) que comprende un orden predeterminado de monómeros de monosacárido y (b) conjugado a un compuesto vehículo. Los conjugados resultantes son más capaces de estimular (ya sea mediante inducción o potenciación) una respuesta inmunitaria en el antígeno de polisacárido microbiano de interés. Como se describe en el presente documento, dichas respuestas inmunitarias son de utilidad en el tratamiento y/o prevención de diversas infecciones que incluyen, pero sin limitación, infecciones *Staphylococcal*.

Diferentes aspectos de la invención se refieren a enlazadores particulares (o agentes de unión o separadores o reactivos de unión, ya que estas expresiones se usan de manera indistinta en el presente documento) y su uso en la síntesis de conjugados. De particular interés son los conjugados de oligosacáridos y diferentes compuestos vehículo. Estos oligosacáridos incluyen oligo- β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucosamina (glucosamina unida, como se cita en el presente documento) que es una entidad compuesta de monómeros de glucosamina unidos entre sí mediante un enlace β -(1 $\rightarrow$ 6). Uno o más de los diferentes monómeros que constituyen la glucosamina unida pueden estar N-acetilados. De este modo, los monómeros pueden ser monómeros de D-glucosamina o monómeros de N-acetil-D-glucosamina, y la glucosamina unida puede comprender un orden definido de uno o ambos tipos de estos monómeros (o monosacáridos, ya que las expresiones se usan de manera indistinta en el presente documento). Las oligoglucosaminas de la invención también comprenden separadores que tienen grupos que contienen tiol en sus extremos "reductores". El separador se utiliza para unir las oligoglucosaminas a los vehículos. Los vehículos pueden comprender aminoácidos (tales como péptidos o proteínas) aunque no están tan limitados.

De este modo, en un aspecto, la invención implica un compuesto de Fórmula I



Fórmula I

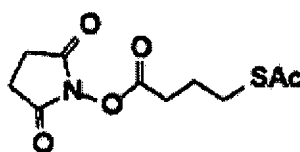
donde X es cualquier átomo o grupo, Y es un grupo de bloqueo de azufre, y n es mayor de 1. En una realización, Y es un grupo acilo. En otra realización, Y es un grupo acetilo y el compuesto tiene la estructura de Fórmula II



Fórmula II

en la que Ac es un grupo acetilo.

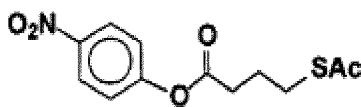
En otra realización más, el compuesto es un éster activado de Fórmula I. En otra realización, el compuesto es un derivado de ciano, azido o haluro, un éster activado de Fórmula I. En otra realización, el compuesto tiene la estructura de Fórmula III



Fórmula III

en la que Ac es un grupo acetilo y el compuesto se denomina como 4-acetilsulfanil butirato de succinimidilo. En otra

realización, el compuesto tiene la estructura de Fórmula IV



Fórmula IV

en la que Ac es un grupo acetilo y el compuesto se denomina como 4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para sintetizar 4-acetilsulfanil butirato de succinimidilo (Fórmula III) que comprende hacer reaccionar ácido 4-acetilsulfanilbutírico (Fórmula V)



Fórmula V

con trifluoroacetato de succinimidilo (CF_3COOSu) para producir 4-acetilsulfanil butirato de succinimidilo (Fórmula III).

En otro aspecto, la invención proporciona un método para sintetizar 4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo (IV) que comprende hacer reaccionar ácido 4-acetilsulfanilbutírico (Fórmula V)



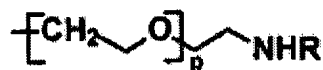
Fórmula V

con trifluoroacetato de N-nitrofenilo (CF_3COOpNp) para producir 4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo (Fórmula IV).

También se desvela un método para sintetizar un oligosacárido conjugado a un vehículo que comprende hacer reaccionar un oligosacárido (a) en primer lugar con un compuesto que tiene una estructura de Fórmula Va o Vb



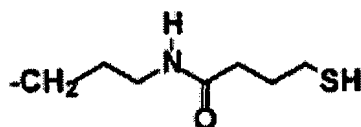
Fórmula Va



Fórmula Vb

en la que m es un número seleccionado de 1 a 10, p es un número seleccionado de 1 a 20 y R es H o un grupo alquilo, (b) en segundo lugar con un compuesto de Fórmula I, II, III o IV, y (c) en tercer lugar con un vehículo, en el que el oligosacárido es glucosamina β -1-6 enlazada.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a una composición que comprende un oligosacárido que incluye un enlazador unido a O-, en el que el enlazador comprende

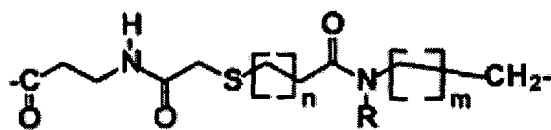


Fórmula VI.

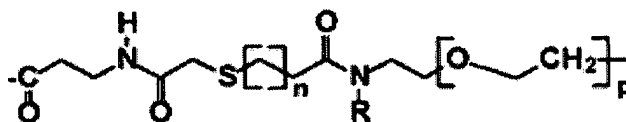
En una realización, el oligosacárido es glucosamina con enlace β -1-6. En otra realización, el oligosacárido tiene 2-20 monómeros en longitud. En otra realización, el oligonucleótido tiene 5-11 monómeros de longitud. En otra realización más, el oligosacárido tiene 7, 9 u 11 monómeros de longitud.

En una realización, el oligosacárido está 0% acetilado o 100% acetilado. En otra realización, el oligosacárido está 0-40% acetilado.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende un conjugado de oligosacárido-vehículo que comprende un oligosacárido conjugado con un vehículo mediante un enlazador que es



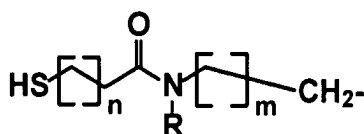
Fórmula VIIIa



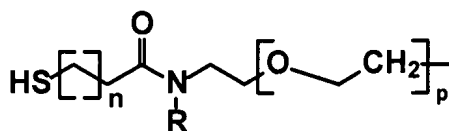
Fórmula VIIIb

en el que el enlazador está unido mediante O- al oligosacárido y unido mediante N al vehículo.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para sintetizar un conjugado de oligosacárido-vehículo que comprende hacer reaccionar un oligosacárido conjugado a un enlazador de Fórmula IXa o IXb

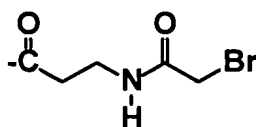


Fórmula IXa



Fórmula IXb

con un vehículo que tiene un grupo amino modificado, siguiendo una reacción con un compuesto de Fórmula



Fórmula X

para producir un oligosacárido conjugado a un compuesto de vehículo a través de un enlazador que tiene una estructura de Fórmula VIIIa o VIIIb.

En una realización, el vehículo es un péptido. En otra realización, el vehículo es una proteína. Un ejemplo de un vehículo es un toxoide del tétanos.

En una realización, el oligosacárido es glucosamina β -1-6 enlazada.

En una realización, la composición tiene una proporción de oligosacárido a vehículo de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1 o 100:1.

En algunas realizaciones, el oligosacárido tiene una longitud de 2-20 monómeros, una longitud de 5-11 monómeros o una longitud de 5, 7, 9 u 11 monómeros.

En una realización, el oligosacárido está un 100 % acetilado. En otra realización, el oligosacárido está un 0 % acetilado. En otra realización más, el oligosacárido está un 0-40 % acetilado.

En algunas realizaciones, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un adyuvante y/o un agente anti-bacteriano.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado de oligosacárido-vehículo como se ha descrito anteriormente o un conjugado de oligosacárido-vehículo sintetizado por un método que se ha descrito anteriormente en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto.

En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto no es humano.

En otra realización, el método comprende además aislar anticuerpos o células formadoras de anticuerpos del sujeto.

En otra realización, el método comprende además administrar un adyuvante al sujeto. En otra realización, el método comprende además administrar un agente antibacteriano al sujeto.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una infección en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que tiene o que está en riesgo de desarrollar una infección una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria de un conjugado de oligosacárido-vehículo como se ha descrito anteriormente o un conjugado de oligosacárido-vehículo sintetizado por un método que se ha descrito anteriormente, en el que la infección está causada por una especie bacteriana que realiza o es capaz de realizar PNAG.

En una realización, la infección es una infección por *Staphylococcus*. En una realización relacionada, la infección por *Staphylococcus* es una infección por *Staphylococcus aureus*. En otra realización relacionada, la infección por *Staphylococcus* es una infección por *Staphylococcus epidermidis*. En una realización, el sujeto está en riesgo de exposición al *Staphylococcus*. En otra realización, el sujeto ha estado expuesto a *Staphylococcus*.

En otras realizaciones, la infección es una infección por *E. coli*, una infección por *Y. pestis*, una infección por *Y. enterocolitica*, una infección por *Y. pseudotuberculosis*, una infección por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, una infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, una infección por *Bordetella pertussis*, una infección por *B. parapertussis*, una infección por *B. bronchiseptica*, una infección por *Acinetobacter*, una infección por *Burkholderia* tal como *Burkholderia cenocepacia*, una infección por *Stenotrophomonas maltophilia*, una infección por *Shigella*, o una infección por *Klebsiella* tal como *Klebsiella pneumoniae*.

En algunas realizaciones, el conjugado de oligosacárido-vehículo se administra con un adyuvante y/o un agente antibacteriano.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para producir anticuerpos que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz, para producir anticuerpos específicos para PNAG naturales, de un conjugado de oligosacárido-vehículo como se ha descrito anteriormente o un conjugado de oligosacárido-vehículo sintetizado por un método como se ha descrito anteriormente, y aislar anticuerpos del sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir anticuerpos monoclonales que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz, para producir anticuerpos específicos para PNAG naturales, de un conjugado de oligosacárido-vehículo como se ha descrito anteriormente o un conjugado de oligosacárido-vehículo sintetizado por un método como se ha descrito anteriormente, recoger células productoras de anticuerpos del sujeto, fusionar las células productoras de anticuerpos procedentes del sujeto con células de mieloma, y recoger el anticuerpo producido a partir de un subclón de fusión.

En una realización, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. En una realización, el sujeto es un conejo. En otra realización, el sujeto es un ser humano.

Se apreciará que todas las combinaciones de los conceptos anteriores así como de conceptos adicionales que se analizarán más detalladamente a continuación (siempre que estos conceptos no sean mutuamente incoherentes) se contemplan como parte de la materia sujeto inventiva divulgada en el presente documento. En particular, todas las combinaciones de la materia sujeto reivindicada que aparecen al final de la divulgación se contemplan como parte de la materia sujeto inventiva divulgada en el presente documento. También se apreciará que la terminología explícitamente empleada en el presente documento que también pueda aparecer en cualquier divulgación incorporada al presente documento por referencia tendrá un significado más coherente con los conceptos particulares divulgados en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A y B son gráficos que muestran la unión de antisueros sensibilizados contra una nona-glucosamina no acetilada (9GlcNH₂) a PNAG (A) o dPNAG (B) de *S. aureus*.

Las figuras 2A y B son gráficos que muestran la unión de antisueros sensibilizados contra una nona-glucosamina completamente acetilada (9GlcNAc) a PNAG o dPNAG de *S. aureus*.

Las figuras 3A y B son gráficos que muestran la unión de antisueros sensibilizados contra 9GlcNAc o 9GlcNH₂ conjugada con 11GlcNAc o 11GlcNH₂.

La figura 4 es un gráfico que muestra la destrucción de las bacterias de la cepa MN8 de *S. aureus* usando un antisuero sensibilizado en dos conejos, de los que uno había recibido el conjugado 9GlcNH₂-TT y el segundo había recibido el conjugado 9GlcNAc-TT con el antisuero tomado 2 semanas después de la última inyección de la vacuna.

La figura 5 es un gráfico que muestra la destrucción de las bacterias de la cepa MN8 de *S. aureus* usando un antisuero sensibilizado en dos conejos, de los que uno había recibido el conjugado 9GlcNH₂-TT y el segundo había recibido el conjugado 9GlcNAc-TT con el antisuero tomado 4 semanas después de la última inyección de la vacuna y también muestra, para su comparación, la destrucción de las mismas bacterias mediante un antisuero sensibilizado a una vacuna conjugada que consiste en la molécula dPNAG de ~ 100 kDa conjugada con el toxoide del tétanos (TT) y posteriormente marcado (051).

Las figuras 6-8 son gráficos que comparan la destrucción de cepas de *S. aureus* (FIGS. 6 y 8, LAC (NT, USA300); La FIG. 7, SF8300 (NT, USA300)) mediante antisueros de conejo (extracción 1) contra oligoglucosamina 9-meros completamente acetilada o no acetilada (9GlcNH₂) conjugada con TT (9GlcNH₂-TT). Para su comparación, la destrucción de las mismas bacterias mediante un antisuero sensibilizado a una vacuna conjugada que consiste en la molécula dPNAG de ~100 kDa conjugada con el toxoide del tétanos (TT) y posteriormente marcado (051). Las figuras 9-16 son gráficos que comparan la destrucción de cepas de *S. aureus* (FIG. 9, MN8 (polisacárido capsular (CP) 8); FIG. 10, LAC (no tipificable (NT), USA300)); FIG. 11, SF8300 (NT, USA300)); FIG. 12, Newman (CP5); FIG. 13, PS80; FIG. 14, Reynolds (CP5); FIG. 15, Reynolds (non-tipificable); FIG. 16, Reynolds (CP8)) mediante antisueros de conejo (extracción 2) contra oligoglucosamina completamente acetilada o no acetilada de 9-meros conjugada con TT. Para su comparación, la destrucción de las mismas bacterias mediante un antisuero sensibilizado a una vacuna conjugada que consiste en la molécula dPNAG de ~100 kDa conjugada con el toxoide del tétanos (TT) y posteriormente marcado (051).

La FIG. 16A es un gráfico que muestra la destrucción de dos cepas de *E. coli* PNAG-positiva (*E. coli* J y *E. coli* P) pero no PNAG-negativa (*E. coli* H) mediante antisuero de conejo contra 9GlcNH₂-TT obtenido 6 semanas después de la última inmunización.

Las figuras 17, 18 y 19 son gráficos que muestran los resultados de un estudio in vivo relacionado con la prevención de abscesos cutáneos con infección de *S. aureus* tras la inmunización con un antisuero sensibilizado contra la oligoglucosamina de 9-meros no acetilada conjugada con TT (9GlcNH₂-TT, extracción 2) y administrada a ratones 24 h antes de la infección con 2×10^4 (FIG. 18), 2×10^5 (FIG. 19) o 2×10^6 (FIG. 20) UFC de la cepa LAC de *S. aureus*.

La FIG. 20 es un resumen de los resultados de las FIGS. 17-19.

Las figuras 21, 22 y 23 son gráficos que muestran los resultados de estudios in vivo relacionados con la prevención de abscesos cutáneos con infección de *S. aureus* tras la inmunización con un antisuero sensibilizado contra la oligoglucosamina de 9-meros no acetilada y administrada a los ratones antes de la infección con 1×10^6 UFC de *S. aureus* MN8 (FIG. 21), 4×10^6 UFC de *S. aureus* Newman (FIG. 22), y 4×10^6 UFC de *S. aureus* NewmanΔica y $1,5 \times 10^6$ UFC de *S. aureus* MN8Δica (FIG. 23).

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere de forma amplia a la síntesis y el uso de conjugados de oligosacárido. La invención proporciona métodos de síntesis de novo y las composiciones usadas en el mismo para generar novedosas composiciones. Estas rutas sintéticas facilitan la modificación del oligosacárido o polisacárido de una forma que no sería posible usando antígenos de polisacáridos naturales.

La invención proporciona, entre otros, métodos para la preparación de oligosacáridos o polisacáridos de oligo-β-(1→6)-D-glucosamina que tienen una orden predefinido de monómeros, métodos para la conjugación de dichos oligosacáridos o polisacáridos a enlazadores para su conjugación posterior con compuestos vehículo, métodos para la preparación de conjugados de oligosacárido-vehículo o conjugados de polisacárido-vehículo, y composiciones de estos diferentes compuestos. La invención se refiere además a diferentes enlazadores novedosos que inesperadamente son más útiles que los enlazadores anteriormente conocidos en estos métodos de preparación. Los conjugados de oligosacárido-vehículo resultantes son útiles para estimular una respuesta inmunitaria in vivo en un ser humano y en sujetos no humanos, incluida la generación de anticuerpos contra los propios oligosacáridos y los correspondientes antígenos PNAG y dPNAG naturales.

Los antígenos PNAG y dPNAG naturales se describen con mayor detalle en la solicitud publicada de la PCT WO 2004/043405. En resumen, PNAG se refiere a poli N-acetilglucosamina que es un polisacárido de la superficie fabricado por diferentes especies bacterianas entre las que se incluyen, aunque no de forma limitativa, *Staphylococci*, tales como *S. aureus* y *S. epidermis*. PNAG se encuentra de forma natural en formas muy acetiladas y poco acetiladas. Una forma de PNAG "fuertemente acetilada" es un PNAG que tiene más de un 50% de sustituciones de acetato. Las formas de PNAG poco acetiladas (denominadas en el presente documento como dPNAG) pueden tener una acetilación de 0-40%. (Véase la Fórmula VII donde R¹ representa la ubicación del grupo acetilo, si está presente). El PNAG natural es una mezcla de formas de PNAG con grados variables de acetilación. El PNAG natural puede incluir dPNAG en una mezcla con formas más acetiladas de PNAG. PNAG o dPNAG pueden comprender cientos o miles o más de unidades (o monómeros) de glucosamina).

Se pretende que los oligosacáridos de la invención imiten regiones de PNAG o dPNAG. De este modo, cuando se utilizan in vivo, los conjugados de oligosacárido-vehículo inducen respuestas inmunitarias dirigidas a regiones del oligosacárido que son similares o idénticas a PNAG y/o dPNAG y, por tanto, dichas respuestas inmunitarias son útiles para dirigirse a especies bacterianas que fabrican o son capaces de fabricar PNAG y/o dPNAG.

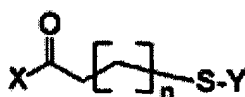
En algunos aspectos de la invención, los oligosacáridos comprenden solamente unidades de D-glucosamina, o solamente N-acetil-D-glucosamina, o una relación predeterminada y orden de ambos tipos de estos monómeros. Se pretende que la relación y el orden imiten, en algunas realizaciones, las relaciones y órdenes que se encuentran en un PNAG natural. Los oligosacáridos se manipulan de acuerdo con la invención para comprender un separador (o un enlazador, ya que los términos se usan de manera indistinta en el presente documento) que tienen un grupo tiol en su extremo (por ejemplo, su extremo reductor).

La preparación de oligosacáridos comprende grupos amino, tal como oligosacáridos de glucosamina unidos (u oligoglucosaminas, ya que los términos se usan de manera indistinta en el presente documento) para su conjugación con uno o más vehículos, ha supuesto un desafío en la técnica. Esto se debe parcialmente a que la síntesis estereoespecífica de la glucosamina unida requiere el uso de grupos acilo N protectores participantes pero temporales (los denominados "grupos participantes") de los donantes de glicosilo para formar el necesario enlace β -glucósido entre los monómeros. N-ftaloilo, N-tricloroetoxicarbonilo y algunos otros restos son adecuados como grupos participantes. Sin embargo, algunos otros grupos participantes son menos adecuados incluidos los grupos participantes de N-acetilo que están presentes en algunos de los oligosacáridos considerados en la invención. A modo de ejemplo, los donantes de glicosilo N-acetilados son de baja reactividad y proporcionan solamente bajos rendimientos de productos de glicosilación. Además, la presencia de grupos N-acetilo en el donante de glicosilo complica la reacción de glicosilación debido a la formación del intermedio oxazolina, la migración de los grupos N-acetilo, y otras reacciones químicas indeseables.

Con respecto a las glucosaminas unidas, su estructura y, más especialmente, el número de grupos amino que contienen, requiere la introducción del enlazador antes de la liberación total de los grupos amino. La eliminación de los grupos protectores de N temporales anteriormente mencionados para preparar el oligosacárido libre se lleva a cabo en condiciones básicas. El reactivo más eficaz para eliminar un grupo participante de N-ftaloilo es el hidrato de hidrazina en etanol en ebullición. Este reactivo también es eficaz para eliminar los grupos protectores de O-acilo incluidos los grupos acetilo y benzoilo que pueden estar incluidos en el oligosacárido de interés.

Los ligandos comercialmente disponibles que se han usado para la unión de ligandos que contienen grupos amino a proteínas son S-acetilthioglicolato de pentafluorofenilo (estructura química 8 mostrada en los Ejemplos) y -acetilsulfanil-propionato de N-hidroxisuccinimidilo 3 (estructura química 12 mostrada en los Ejemplos). Estos reactivos enlazadores se pueden usar para introducir un resto tiol en un oligosacárido; sin embargo, como se describe con mayor detalle en los Ejemplos, ambos son inestables en las condiciones de eliminación de los grupos ftaloilo. El Ejemplo 5 muestra que un enlazador basado en ácido tioglicólico experimenta reordenamiento oxidativo, y el Ejemplo 6 muestra que un derivado del ácido 3-mercaptopropiónico proporciona una mezcla compleja de productos secundarios. Ambas transformaciones dan como resultado la pérdida de la necesaria función tiol.

Por tanto, la invención se basa en parte en el descubrimiento y el uso de una clase de enlazadores que es eficaz y mejor que los enlazadores anteriormente conocidos para conjugar oligosacáridos (incluidas las versiones que contienen amina de los mismos) con un vehículo tal como una proteína. Esta clase de enlazadores se define como derivados del ácido ω -acetilsulfanil carbónico de Fórmula I (donde $n > 1$).



Fórmula I

Esta clase de enlazadores proporciona una N-acilación eficaz durante la unión a un oligosacárido. El enlazador puede ser un éster activo de Fórmula I o su derivado ciano, azido, o haloide. Puede haber otro derivado de Fórmula I siempre que dicho derivado sea activo como agente acilante y por tanto adecuado para su unión a los oligosacáridos de la presente invención. Y representa un grupo bloqueante temporal de átomos de azufre, que son conocidos en la técnica y que incluyen grupos acilo y acetilo. La eliminación del grupo Y libera un grupo SH que es necesario para la unión del oligosacárido al vehículo. X representa cualquier grupo saliente que proporcione la capacidad acilante necesaria al compuesto de Fórmula I.

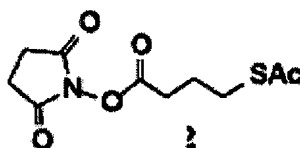
Se entenderá que cualquiera de las clases de enlazadores proporcionadas por la invención se puede usar para conjugar los oligosacáridos con los compuestos vehículo.

A modo de ejemplo, una clase de enlazador puede comprender la estructura de Fórmula II (donde $n > 1$):



Fórmula II.

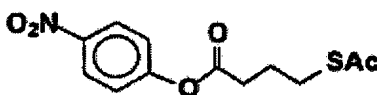
Como otro ejemplo, otra clase de enlazador puede comprender derivados de succinimidilo. Un ejemplo de tal enlazador, como se describe en los Ejemplos 1 y 3, es 4-acetilsulfanil butirato de succinimidilo (compuesto 2 en el Esquema 1, Ejemplos 1 y 3). El enlazador tiene la estructura de Fórmula III como se indica a continuación:



Fórmula III.

El enlazador es estable en condiciones de desprotección total de carbohidratos, tales como oligosacáridos y polisacáridos.

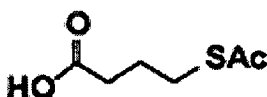
Otro ejemplo de un éster activado es 4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo (compuesto 3, Ejemplos 2 y 3). Este compuesto tiene la estructura de Fórmula IV como se indica a continuación:



Fórmula IV

(4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo).

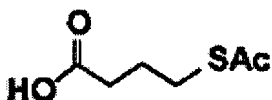
La invención proporciona un método para sintetizar 4-acetilsulfanil butirato de succinimidilo (Fórmula III). Este método implica hacer reaccionar ácido 4-acetilsulfanilbutírico (Fórmula V)



Fórmula V

con trifluoroacetato de N-hidroxisuccinimidilo (CF_3COOSu) para producir 4-acetilsulfanil butirato de succinimidilo (Fórmula III).

La invención también proporciona un método para sintetizar 4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo (Fórmula IV). Este método implica hacer reaccionar ácido 4-acetilsulfanilbutírico (Fórmula V)



Fórmula V

con trifluoroacetato de N-nitrofenilo (CF_3COOpNp) para producir 4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo (Fórmula IV).

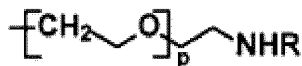
Estos métodos de síntesis se describen en mayor detalle en los Ejemplos.

La invención proporciona adicionalmente composiciones que comprenden un oligosacárido que comprende un enlazador conjugado con el átomo O1 de la unidad de glucosamina en el "extremo reductor" del oligosacárido. Este enlazador conjugado con O1 se utiliza para unir un enlazador que contiene SH vía la reacción con el compuesto de Fórmula I. El enlazador conjugado con O1 tiene la estructura de la Fórmula Va (más adelante) que tiene un grupo

aminoalquilo y donde m está comprendido entre 1 y 10 y R puede ser H o un grupo alquilo simple (por ejemplo, un grupo metilo o etilo). Como alternativa, un enlazador conjugado con O1 puede tener la estructura de la Fórmula Vb (más adelante) donde p puede variar entre 1 y 20 y R es el mismo que en la Fórmula Va.

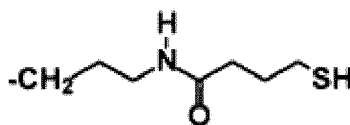


Fórmula Va



Fórmula Vb

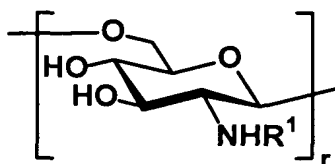
Los conjugados de oligosacárido divulgados en el presente documento se pueden sintetizar, por tanto, acoplando los compuestos de Fórmula Va o Vb con el compuesto de Fórmula I. La transformación y posterior eliminación del grupo bloqueante de S temporal (Ejemplo 8) o la reducción del correspondiente intermedio de disulfuro (Ejemplo 7) da como resultado la generación de un grupo enlazador final utilizado en la conjugación del oligosacárido con un compuesto vehículo. Dichos grupos enlazadores finales se describen en los Ejemplo 7 y 8 tienen la estructura de la Fórmula VI



Fórmula VI.

El oligosacárido puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 monómeros de monosacáridos. En algunas realizaciones importantes, el oligosacárido comprende 5 o más monómeros incluidos 5, 7, 9 u 11 monómeros. En algunas realizaciones, el oligosacárido comprende 2-20 monómeros, o 3-20 monómeros, o 4-20 monómeros, o 5-20 monómeros.

En algunas realizaciones importantes, el monómero es glucosamina y el oligosacárido es una glucosamina enlazada. La estructura de un monómero de glucosamina (como está presente en una glucosamina enlazada) es la siguiente:

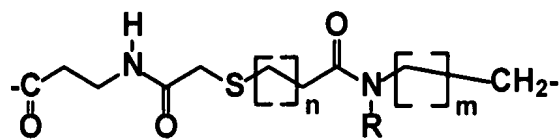


Fórmula VII

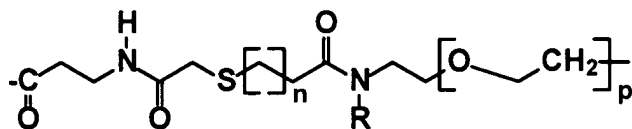
donde R^1 es H en el caso de unidades de glucosamina con un grupo amino "libre", o R^1 es un grupo acetilo (COCH_3) en el caso de unidades de glucosamina N-acetiladas. Estas unidades están conectadas mediante enlaces β -(1→6). Se puede unir cualquier número de unidades de glucosamina, incluidas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, o más unidades hasta 100 unidades (tanto sustituidas con grupos acetilo o no sustituidas).

El grado de N-acetilación en los compuestos de Fórmula VII puede variar. Este puede variar de un 0-50 % de N-acetilación (es decir, un 0-50 % de R^1 son grupos acetilo), incluyendo un 0-40 % de N-acetilación. En algunas realizaciones, la glucosamina β -(1→6) enlazada es menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 20 %, menos del 10 % o menos de 5 % de N-acetilada. En algunas realizaciones importantes, el nivel de N-acetilación y la posición de los grupos acetilo en un oligosacárido son conocidos en virtud del método de síntesis. Es decir, el oligosacárido puede sintetizarse a partir de la disposición ordenada de unidades de glucosamina que tienen o carecen de grupos N-acetilo. Los Ejemplos proporcionan métodos para producir oligosacáridos que tienen definidas y ordenadas sustituciones de acetilo. Además, puede hacerse referencia a Gening et al. Carbohydrate Research 2007 342:567-575, Gening et al. Russian J Bioorganic Chem 2006 32(4):389-399, Yang y Du Carbohydrate Research 2003 338:495-502, Yang et al. Carbohydrate Research 2003 338:1313-1318, y Fridman et al. Organic Letters 2002 4(2):281-283.

La invención además proporciona también una composición que comprende un conjugado de oligosacárido-vehículo que comprende un oligosacárido conjugado a un compuesto de vehículo a través de un enlazador de Fórmula VIIIa o VIIIb.



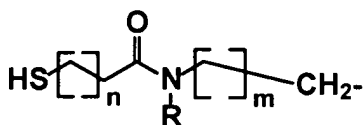
Fórmula VIIIa



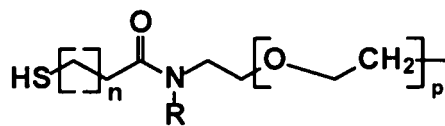
Fórmula VIIIb

en la que el enlazador está O-enlazado al oligosacárido y N-enlazado al compuesto de vehículo.

La invención también proporciona un método para sintetizar un conjugado de oligosacárido-vehículo haciendo reaccionar conjugados de oligosacárido que comprenden enlazadores SH-terminados, tales como los que tienen estructuras de Fórmula IXa o IXb



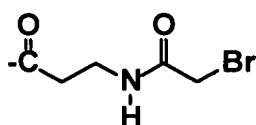
Fórmula IXa



Fórmula IXb

(en el caso de compuestos de los Ejemplos 7 y 8)

con un compuesto de vehículo en el que los grupo amino terminales se modifican mediante la unión de un compuesto de Fórmula X



Fórmula X

para producir un oligosacárido conjugado a un compuesto de vehículo a través de un enlazador que tiene una estructura de Fórmula VIIIa o VIIIb.

En algunas realizaciones, un enlazador de Fórmula VIIIa o VIIIb se une a través de su grupo terminal CH₂ al átomo O1 de la unidad de glucosamina en el "extremo reductor" del oligosacárido. Dicho enlazador se considera una unión de O y el oligosacárido se denomina como que está O-enlazado al enlazador.

En algunas realizaciones, un enlazador de Fórmula VIIIa o VIIIb se une a través del grupo CO terminal a un grupo amino en el compuesto de vehículo mediante un enlace de amida. Tal enlazador se considera un enlazador de N y el vehículo se denomina como que está N-enlazado al enlazador.

La preparación de conjugados de un vehículo que contiene un grupo amino y oligoglucosaminas que tienen un enlazador SH-terminado, como se describe anteriormente y en los Ejemplos 8 y 9, puede usar el reactivo SBAP. Sin embargo, la invención contempla el uso de otros reactivos adecuados para enlazar vehículos que contienen un grupo amino y oligosacáridos SH-terminados (particularmente como se describe por G. Hermanson "Bioconjugate Techniques", 2ª edición, Academic Press, 2008).

Compuesto de vehículo

Un "compuesto de vehículo" (o vehículo, puesto que los términos se usan de manera intercambiable en el presente documento) como se usa en el presente documento es un compuesto que está conjugado al oligosacárido a través del uso de un enlazador de la invención. Normalmente, el compuesto de vehículo es uno que potencia la respuesta inmunitaria para el ligando de oligosacárido.

Los compuestos vehículo incluyen, pero no se limitan a proteínas, péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, u otros polímeros, lípidos, y pequeñas moléculas oligoméricas, especialmente los dendrímeros. En algunas realizaciones, el compuesto vehículo puede ser de origen natural o se puede derivar de una entidad natural. Las proteínas incluyen, por ejemplo, proteínas plasmáticas tales como albúmina de suero, inmunoglobulinas, apolipoproteínas y transferrina; polipéptidos bacterianos tales como el toxoide del tétanos (TT), TRPLE, β -galactosidasa, polipéptidos tales como la proteína gD del herpes, alérgenos, toxoide de la difteria, flagelina de salmonela, pilina de hemophilus, proteínas de membrana de hemophilus de 15 kDa, 28-30 kDa y 40 kDa, enterotoxina LTB con etiqueta térmica de *Escherichia coli*, toxina colérica, y proteínas víricas que incluyen rotavirus VP y las proteínas f y g del virus sincitial respiratorio. Los vehículos útiles en la invención incluyen cualquier proteína que sea segura para su administración a mamíferos y opcionalmente que sea una proteína vehículo inmunológicamente eficaz. De este modo, en algunas realizaciones, el compuesto vehículo puede ser inmunógeno por sí mismo. Los ejemplos incluyen compuestos que se han usado en o como vacunas contra una especie bacteriana tal como, aunque no de forma limitativa, las citadas en el presente documento.

Los compuestos vehículo que son especialmente útiles para la inmunización incluyen proteínas tales como las hemocianinas de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de la soja. Se puede utilizarse de forma similar cualquier otro compuesto que sea inmunógeno para la especie de animal a inmunizar.

Como se muestra en los Ejemplos, la proporción entre el oligosacárido y el vehículo en los conjugados de oligosacárido-vehículo de la invención puede variar. Por ejemplo, un conjugado de oligosacárido-vehículo puede tener una proporción entre el oligosacárido y el vehículo de 1:1, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1 o al menos 10:1. En otras realizaciones más, la proporción puede ser al menos 20:1, al menos 30:1, al menos 40:1, al menos 50:1, al menos 60:1, al menos 70:1, al menos 80:1, al menos 90:1, o superior, hasta por ejemplo 100:1 o 700:1 dependiendo de la capacidad del compuesto vehículo para unir los ligandos de oligosacárido. A modo de ejemplo, un conjugado que tiene una proporción entre el oligosacárido y el vehículo de al menos 3:1 es un conjugado que tiene al menos tres restos de oligosacárido unidos a una sola molécula de compuesto vehículo.

Utilidad

Las composiciones de la invención tienen numerosos usos *in vitro* e *in vivo* usos. Por ejemplo, las composiciones de la invención son de utilidad para producir una respuesta de anticuerpos, *por ejemplo*, como vacuna para la inmunización activa de seres humanos y animales para prevenir la infección por especies de bacterias que fabrican o son capaces de fabricar PNAG natural, incluidos, aunque no de forma limitativa, *Staphylococcus*; como vacuna para la inmunización de seres humanos o animales para producir anticuerpos dirigidos contra dPNAG que se pueden administrar a otros seres humanos o animales para prevenir o tratar infecciones por especies de bacterias que fabrican o son capaces de fabricar PNAG natural, incluidos, aunque no de forma limitativa, *Staphylococcus*; como un antígeno para cribar agentes biológicos tales como anticuerpos monoclonales capaces de prevenir la infección por especies de bacterias que fabrican o son capaces de fabricar PNAG natural, incluidos, aunque no de forma limitativa *Staphylococcus*, bibliotecas de genes implicados en la producción de anticuerpos, o peptidomiméticos; como reactivo de diagnóstico para infecciones por especies de bacterias que fabrican o son capaces de fabricar PNAG natural, incluidos, aunque no de forma limitativa, *Staphylococcus*; y como reactivo de diagnóstico para determinar el estado inmunitario de seres humanos o animales con respecto a su susceptibilidad a infecciones por especies de bacterias que fabrican o son capaces de fabricar PNAG natural, incluidos, aunque no de forma limitativa *Staphylococcus*.

Tratamiento y prevención de infecciones

La invención proporciona un método para tratar o prevenir una infección por especies de bacterias que fabrican o son capaces de fabricar PNAG natural, incluidos, aunque no de forma limitativa *Staphylococcus*, en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar tal infección una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria de un conjugado de oligosacárido-vehículo de la invención.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para evaluar la capacidad de los conjugados de la invención para proteger de la infección por especies de bacterias que fabrican o son capaces de fabricar PNAG natural, incluidos, aunque no de forma limitativa *Staphylococcus*, en un sujeto. El método implica administrar al sujeto una cantidad eficaz del conjugado, en el que el conjugado induce actividad inmunitaria, exponer el sujeto a la especie bacteriana que fabrica o es capaz de fabricar PNAG natural, y analizar la presencia de la especie bacteriana en el

sujeto.

El sujeto puede ser uno que sea un sujeto en riesgo de exposición a la especie bacteriana, o uno que haya estado expuesto a la especie bacteriana. El conjugado se puede administrar en una composición junto con otros agentes tales como, aunque no de forma limitativa, uno o más adyuvantes, y uno o más agentes antibacterianos, etc.

La infección puede ser una infección por *Staphylococcus*. La infección por *Staphylococcus* puede ser una infección por *Staphylococcus aureus*, una infección por *Staphylococcus epidermidis*, aunque no está tan limitada. La infección puede ser una infección por *E. coli*, una infección por *Y. pestis*, una infección por *Y. enterocolitica*, una infección por *Y. pseudotuberculosis*, una infección por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, una infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, una infección por *Bordetella pertussis*, una infección por *B. parapertussis*, una infección por *B. bronchiseptica*, una infección por *Acinetobacter* incluida una infección por organismos del complejo *Acinetobacter*, una infección por *Burkholderia* incluida una infección por organismos del complejo *Burkholderia*, una infección por *Stenotrophomonas maltophilia*, una infección por *Shigella* (diferentes especies), y una infección por *Klebsiella* (diferentes especies).

Los anticuerpos generados de acuerdo con la invención también se pueden usar para prevenir o tratar la infección por cualquier microbio infeccioso o patógeno que fabrique una molécula que reaccione con los anticuerpos inducidos por una respuesta inmunitaria contra el conjugado de oligosacárido-vehículo.

Una "cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de anticuerpos)", tal como se usan en el presente documento, es una cantidad que es suficiente para (i) ayudar al sujeto a producir su propia protección inmunitaria mediante, por ejemplo, inducción de la producción de anticuerpos en el sujeto, inducir la producción de células de memoria, y posiblemente una reacción de linfocitos citotóxicos etc. y/p (ii) prevenir que se produzca la infección en un sujeto que está expuesto a un microbio infeccioso o patógeno que fabrica o puede fabricar PNAG, incluidos, aunque no de forma limitativa *Staphylococcus*.

En algunas realizaciones preferidas, la cantidad eficaz de una vacuna para estimular una respuesta inmunitaria es una cantidad de vacuna que es capaz de activar la producción de anticuerpos que tienen reactividad cruzada con al menos dos especies de *Staphylococcus*, por ejemplo, *S. aureus* y *S. epidermidis*.

El experto en la técnica puede evaluar si es una cantidad suficiente para inducir una inmunidad activa con métodos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de un conjugado específico para producir anticuerpos en un mamífero se puede evaluar cribando los anticuerpos en un ratón u otro sujeto usando conjugados o sus correspondientes oligosacáridos.

Los sujetos, tal como se usa en el presente documento, incluyen seres humanos y sujetos no humanos. Los sujetos no humanos incluyen, aunque no de forma limitativa, los animales de compañía tales como perros, gatos, hurones, aves y similares, animales de granja tales como vacas, cerdos, cabras, ovejas, caballos, pollos, y similares, animales de zoo, tales como jirafas, leones, tigres, elefantes, osos, y similares, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, y similares. El sujeto puede ser un ser humano de más de 60 años de edad. El sujeto puede ser uno que está malo.

Los sujetos a tratar de acuerdo con la invención incluyen pacientes hospitalizados que están en riesgo de desarrollar una infección por *Staphylococcal* como resultado de la exposición a las bacterias en el entorno hospitalario. Las poblaciones con elevado riesgo concreto para desarrollar una infección por *S. aureus* incluyen, por ejemplo, pacientes con enfermedad renal en diálisis, e individuos que se someten a cirugía de alto riesgo. Las poblaciones en riesgo elevado de desarrollar una infección por *S. epidermidis* también incluyen, por ejemplo, pacientes con dispositivos médicos internos, tales como líneas intravenosas (por ejemplo, líneas centrales), o prótesis (por ejemplo, prótesis de sustitución de rodilla o de cadera), puesto que los aislados clínicos suelen ser muy adherentes a las superficies de plástico. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto que ha recibido el implante de un dispositivo médico y, en otras realizaciones, el sujeto es uno que no ha recibido el implante de un dispositivo médico sino que está previsto que reciba uno. Los sujetos en riesgo elevado de desarrollar una infección por *S. epidermidis* incluyen además, por ejemplo, neonatos a pretérmino y pacientes que reciben quimioterapia. Los sujetos adicionales a tratarse de acuerdo con la invención incluyen pacientes hospitalizados o individuos de la comunidad que estén enfermos y estén en riesgo de desarrollar infecciones con microbios que fabrican o son capaces de fabricar PNAG como resultado de una exposición a las bacterias en un entorno hospitalario o comunitario.

Inducción de respuesta inmunitaria y generación de anticuerpos

La invención proporciona además métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita un conjugado de oligosacárido-vehículo de la invención en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Puede ser una respuesta inmunitaria celular y/o humoral. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria puede dar como resultado la producción de anticuerpos y/o de células productoras de anticuerpos. "Inmunidad pasiva" tal como se usa en el presente documento, implica la administración de anticuerpos al sujeto, en

el que los anticuerpos se producen en un sujeto diferente (incluidos sujetos de la misma especie y de especies diferente yes), de tal forma que los anticuerpos se adhieren a la superficie de la bacteria y hacen que la bacteria se pueda fagocitar.

5 Los anticuerpos generados usando los conjugados de la invención se pueden administrar a cualquier sujeto que esté en riesgo de desarrollar una infección por una especie que fabrica PNAG o una especie que fabrica otra molécula que reacciona con los anticuerpos para inducir inmunidad pasiva y, en algunas realizaciones, puede estar especialmente adecuados para sujetos que no pueden inducir una inmunidad activa. Puesto que la vacunación con el antígeno puede no ser completamente eficaz en sujetos inmunodeprimidos de alto riesgo, estos sujetos se
10 beneficiarán del tratamiento con preparaciones de anticuerpos sensibilizados contra los conjugados de oligosacárido-vehículo de la invención para prevenir o tratar infecciones tales como las producidas por *Staphylococcus aureus*. Un sujeto que no puede inducir una respuesta inmunitaria es un sujeto inmunodeprimido (por ejemplo, un paciente que recibe quimioterapia, un paciente con SIDA, etc.) o un sujeto que no ha desarrollado aún un sistema inmunitario (por ejemplo, un neonato a pretérmino).

15 De este modo, la invención proporciona un método para producir anticuerpos que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz para producir anticuerpos específicos de la molécula PNAG expresada por un organismo tal como *Staphylococcus* utilizando un conjugado de oligosacárido-vehículo de la invención, y aislar después los anticuerpos del sujeto. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales. Los anticuerpos pueden estar
20 adicionalmente modificados.

La invención proporciona además un método para producir anticuerpos monoclonales que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz para producir anticuerpos específicos de la molécula PNAG utilizando un conjugado de oligosacárido-vehículo de la invención, recoger células productoras de anticuerpos de cualquier tejido que contenga
25 dichas células tal como el bazo o la sangre del sujeto, fusionar las células productoras de anticuerpos procedentes del sujeto con células de mieloma, y recoger el anticuerpo producido a partir de un subclón de fusión.

La invención contempla la generación de varios anticuerpos específicos de las oligo- β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucosaminas de la presente invención. Estos incluyen anticuerpos quiméricos tales como anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo, así como anticuerpos monoclonales y policlonales intactos. Un "anticuerpo monoclonal humanizado" tal como se usa en el presente documento, es un anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcionalmente activo del mismo que tiene al menos regiones constantes humanas y una región de unión a antígeno (tal como 1, 2, 3, 4, 5, o 6 CDR, o 1 o 2 regiones variables, o fragmentos Fab o F(ab)₂) de una especie diferente a la humana. Los anticuerpos monoclonales humanizados, por ejemplo, se pueden construir sustituyendo las regiones no CDR de un anticuerpo
30 de mamífero no humano por regiones similares de anticuerpos humanos, reteniendo a la vez la especificidad epitópica del anticuerpo original. Por ejemplo, las CDR no humanas y opcionalmente, algunas de las regiones marco, se pueden unir covalentemente a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional. La solicitud de patente europea 0239400, cuyo contenido íntegro se incorpora al presente documento como referencia, proporciona una enseñanza ilustrativa de la producción y el uso de anticuerpos monoclonales humanizados en los
35 que al menos una parte de la CDR de un anticuerpo murino (o de otro mamífero no humano) se ha incluido con el anticuerpo humanizado. Existen entidades en Estados Unidos que sintetizan anticuerpos humanizados a partir de regiones de anticuerpo de murino concretas de una forma comercial, tal como Protein Design Labs (Mountain View California), Abgenix, y Medarex.

45 Un anticuerpo monoclonal humanizado intacto en una forma aislada o en una preparación farmacéutica está especialmente adecuado para algunos aspectos de la invención. Los anticuerpos humanizados tienen una especial utilidad clínica porque no producen una respuesta inmunitaria en los seres humanos contra el propio anticuerpo. En una realización preferida, una CDR de murino se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, L. Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988); M. S. Neuberger et al., Nature 314, 268 (1985) y el documento EPA 0 239 400 (publicado el 30 de septiembre de 1987).
50

Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden fabricar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la materia, tales como los que se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 5.567.610, concedida a Borrebaeck et al., patente de Estados Unidos n.º 565.354, concedida a Ostberg, patente de Estados Unidos n.º 5.571.893, concedida a Baker et al, Kozber, J. Immunol. 133: 3001 (1984), Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, Nueva York, 1987), y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86-95 (1991).
55

Además de los métodos convencionales para preparar anticuerpos monoclonales humanos, dichos anticuerpos también se pueden preparar inmunizando animales transgénicos que son capaces de producir los anticuerpos humanos (por ejemplo, Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993), Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993), Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993) y patente de Estados Unidos n-º 5.569.825 concedida a Lonberg).
60

65 Los anticuerpos humanos también se pueden obtener recuperando los linfocitos productores de anticuerpos de la sangre y otros tejidos de los seres humanos. Estos linfocitos se pueden tratar para producir células que crecen por sí

5 mismas en el laboratorio en las condiciones de cultivo adecuadas. Los cultivos celulares se pueden seleccionar para la producción de anticuerpos contra los conjugados de la invención y posteriormente clonarse. Los cultivos clónicos se pueden usar para producir anticuerpos monoclonales humanos, o los elementos genéticos que codifican las partes variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo se pueden clonar e insertar en vectores de ácido nucleico para la producción de anticuerpos de diferentes tipos.

10 Los fragmentos de anticuerpo también están abarcados por la invención. Los fragmentos de anticuerpo funcionalmente activos bien conocidos incluyen, aunque no de forma limitativa, fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd de anticuerpos. Estos fragmentos, que carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Por ejemplo, los anticuerpos monocatenarios se pueden construir de acuerdo con los métodos descritos en la patente de Estados Unidos N.º 4.946.778 concedida a Ladner et al. Dichos anticuerpos monocatenarios incluyen las regiones variables de las cadenas ligera y pesada unidas por un resto enlazador flexible. También se han publicado métodos para obtener anticuerpos de dominio único ("Fd") que comprenden un dominio único variable de cadena pesada (véase, por ejemplo, Ward et al., Nature 341:644-646 (1989), que divulga un método para seleccionar e identificar una región variable de cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de un solo dominio V_H) con suficiente afinidad por su epítipo diana para unirse al mismo en forma aislada). Los métodos para preparar fragmentos Fv recombinantes basados en secuencias conocidas de regiones variables de cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo son conocidos y se han descrito, por ejemplo, Moore et al., patente de Estados Unidos n.º 4.462.334. Otras referencias que describen el uso y generación de fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab (Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985)), fragmentos Fv (Hochman et al., Biochemistry 12: 1130 (1973); Sharon et al., Biochemistry 15: 1591 (1976); Ehrlich et al., patente de Estados Unidos n.º 4.355.023) y porciones de moléculas de anticuerpo (Audilore-Hargreaves, patente de Estados Unidos n.º 4.470.925). De este modo, los expertos en la técnica pueden construir fragmentos de anticuerpo a partir de diferentes porciones de anticuerpos intactos sin destruir la especificidad de los anticuerpos.

Composiciones y preparaciones farmacéuticas

30 Las composiciones de la invención, incluidos, por ejemplo, los conjugados de oligosacárido-vehículo de la invención, se pueden formular junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento, significa una o más cargas, sólidas o líquidas, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para su administración a seres humanos u otros animales. En la presente invención, el término "vehículo" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse con los conjugados, y entre sí, de una forma en la que no hay interacción que altere sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

40 De este modo, la composición de la presente invención se puede considerar como una preparación farmacéutica. Se puede usar *in vivo*, pero su uso no está tan limitado. Cuando se usa *in vivo*, se puede usar en sujetos humanos o no humanos, con fines terapéuticos, profilácticos, o de investigación. A modo de ejemplo, las composiciones se pueden usar para generar anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos en sujetos no humanos tales como ratones, conejos, y otros hospedadores animales adecuados.

45 Por tanto, la invención proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los conjugados de oligosacárido-vehículo anteriores, que se pueden usar como vacunas. Estas preparaciones pueden comprender los conjugados en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, tal como una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Estas preparaciones pueden comprender otros constituyentes o componentes, tal como, aunque no de forma limitativa, adyuvantes y agentes antibacterianos. Dichas preparaciones pueden contener de forma habitual concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponadores, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes y, opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

50 Un medio vehículo adecuado para formular una vacuna incluye solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) o gel de fosfato de aluminio 0,125 M suspendido en solución salina tamponada con fosfato a pH 6 y otros medios convencionales. En general, las vacunas contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 µg, y preferiblemente de aproximadamente 10-50 µg del antígeno para activar niveles eficaces de anticuerpos en mamíferos de sangre caliente.

60 Un adyuvante es cualquier sustancia que se incorpora o se administra (simultáneamente o de otra forma) con un antígeno, que potencia la respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. Los adyuvantes incluyen, aunque no de forma limitativa, compuestos de aluminio, por ejemplo, geles, hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, y adyuvante completo o incompleto de Freund (por ejemplo, en el que el antígeno se incorpora en la fase acuosa de una emulsión estabilizada de agua en aceite de parafina). El aceite de parafina se puede sustituir por diferentes tipos de aceites, por ejemplo, escualeno o aceite de cacahuete. Otros materiales con propiedades adyuvantes incluyen BCG (*Mycobacterium tuberculosis*) atenuado, fosfato de calcio, levamisol, isoprinosina, polianiones (por ejemplo, poli A:U), lentinano, toxina de la tosferina, lípido A, saponinas, QS-21 y péptidos, por ejemplo, dipéptido de muramilo, y oligonucleótidos inmunoestimuladores, tales como oligonucleótidos CpG. Las sales de tierras raras, por ejemplo,

lantano y cerio, también se pueden usar como adyuvantes. La cantidad de adyuvantes depende del sujeto y el antígeno en particular utilizado, y el experto en la técnica puede determinarla fácilmente sin experimentación excesiva.

5 Un agente antibacteriano es un agente que destruye bacterias (por ejemplo, mediante lisis) o impide su división. El uso de antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas es algo rutinario. Los agentes antibacterianos incluyen penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, ciclacilina, epicilina, hetacilina, pivampicilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, carbenicilina, ticarcilina, avlocilina, mezlocilina, piperacilina, amdinocilina, cefalexina, cefradina, cefadroxil, cefaclor, cefazolina, cefuroxima
10 axetil, cefamandol, cefonicid, cefoxitina, cefotaxima, ceftizoxima, cefmenoxina, ceftriaxona, moxalactam, cefotetan, cefoperazona, ceftazidima, imipenem, clavulanato, timentín, sulbactam, neomicina, eritromicina, metronidazol, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, vancomicina, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y rifampina. (Véase Goodman y Gilman, *Pharmacological Basics of Therapeutics*, 8ª Ed., 1993, McGraw Hill Inc.)

15 Los conjugados se pueden unir covalentemente o no covalentemente a otros restos incluyendo, aunque no de forma limitativa, marcas detectables tales como agentes de obtención de imágenes, fluoróforos, enzimas, y similares.

20 Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden cómodamente una preparación acuosa estéril, que puede ser isotónica con la sangre del receptor. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, aceites fijos estériles, se usan convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Con este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico, son de utilidad en la preparación de los inyectables. Las formulaciones de vehículos adecuados para la
25 administración subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, etc. se pueden encontrar en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Las preparaciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una cantidad eficaz, tal como se ha analizado anteriormente, en algunos casos, es aquella cantidad que sola, o junto con dosis adicionales, induce una
30 inmunidad activa o pasiva dependiendo del sujeto. Se cree que dosis comprendidas entre 1 nanogramo/kilogramo a 100 miligramos/kilogramo, dependiendo del modo de administración, será eficaz. Se cree que el intervalo preferido está comprendido entre 500 nanogramos y 500 microgramos/kilogramo, y lo más preferible, entre 1 microgramo y 100 microgramos/kilogramo. La cantidad absoluta dependerá de varios factores, que incluyen si la administración se lleva a cabo en un sujeto de alto riesgo aún no infectado con la bacteria o en un sujeto ya que tiene una infección, el
35 tratamiento concomitante, el número de dosis y los parámetros individuales del paciente incluyendo la edad, estado físico, tamaño y peso. Estos son factores bien conocidos del experto en la técnica, y se pueden determinar simplemente con experimentación rutinaria. Se prefiere generalmente que se utilice una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según el criterio médico razonado.

40 Se contemplan múltiples dosis de las composiciones de la invención. Por lo general, los esquemas de inmunización implican la administración de una dosis elevada de un antígeno seguido por dosis inferiores posteriores de antígeno después de un período de descanso de varias semanas. También se pueden administrar dosis adicionales. El programa de dosificación para una inmunización pasiva será bastante diferente, con administraciones más frecuentes si es necesario. Se puede usar cualquier régimen que dé como resultado una respuesta inmunitaria mejorada a una infección bacteriana y/o la posterior protección de la infección. El experto en la técnica puede
45 determinar los intervalos de tiempo deseados para administrar múltiples dosis de un conjugado concreto empleando simplemente experimentación rutinaria.

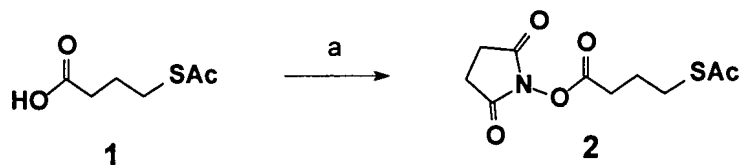
Están disponibles varias rutas de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del conjugado concreto seleccionado, de la dolencia concreta que se está tratando y de la dosificación requerida para la
50 eficacia terapéutica. Los métodos de la invención, hablando de manera general, se pueden llevar a la práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de una respuesta inmunitaria sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Los modos de administración preferidos son las vías parenterales. El término "parenteral" incluye inyección subcutánea,
55 intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, e intrasternal, o técnicas de infusión. Otras vías incluyen, aunque no de forma limitativa, la oral, nasal, dérmica, sublingual, y local.

Los siguientes Ejemplos se incluyen con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

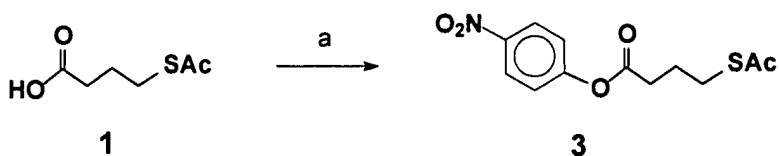
60 Ejemplos

Se ilustran adicionalmente aspectos de la invención mediante los siguientes Ejemplos no limitantes. Estos Ejemplos ilustran, entre otros, cómo preparar los oligosacáridos de oligo- β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucosamina y cómo conjugar tales oligosacáridos a vehículos, tales como vehículos de proteína. Tales conjugados pueden usarse, *entre otras*, como
65 vacunas.

Ejemplo 1. Síntesis de 4-acetilsulfanilbutirato de N-hidroxisuccinimidilo 2

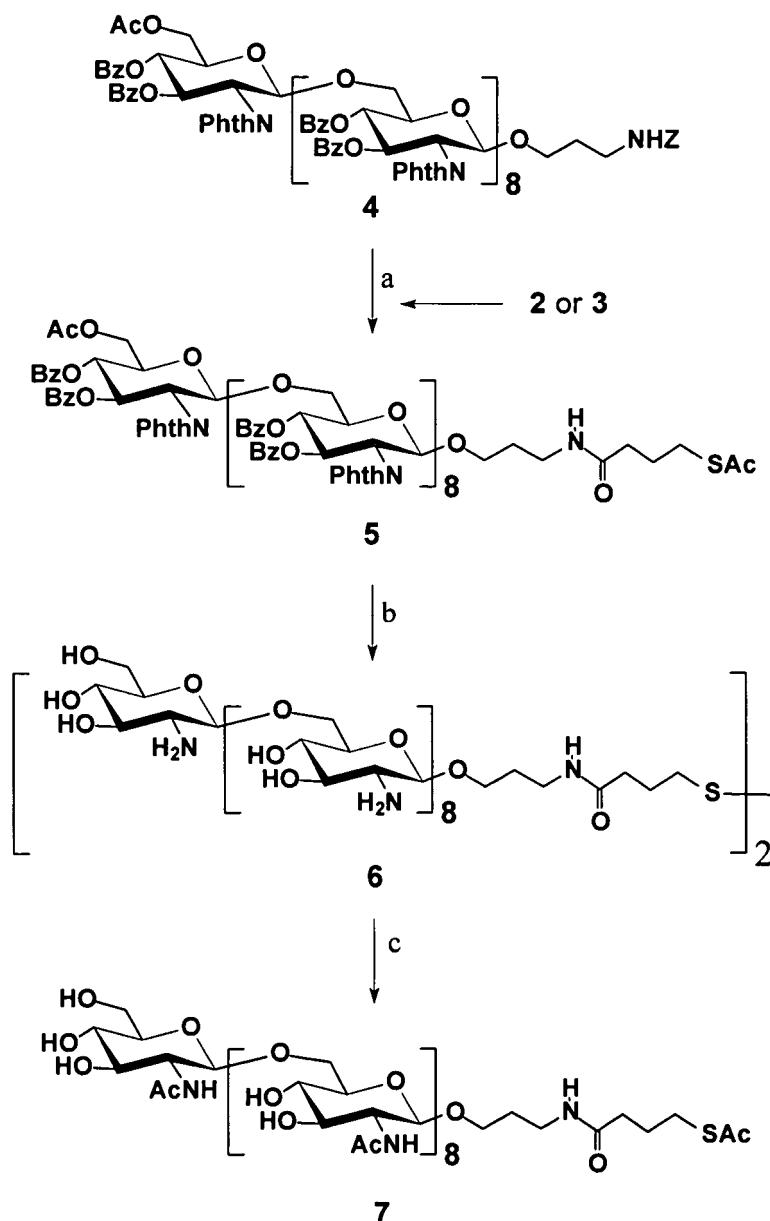
Esquema 1. Síntesis del reactivo enlazador 2. a: CF₃COOSu, piridina.

A una solución del ácido **1** (Hogg, J. Heather; Ollmann, Ian R.; Wetterholm, Anders; Andberg, Martina Blomster; Haeggstroem, Jesper; et al.; Chem. Europ. J.; EN; 4; 9; 1998; 1698-1713) (237 mg, 1,46 mmol) y trifluoroacetato de N-hidroxisuccinimidilo (431 mg, 2,02 mmol) en diclorometano (4 ml) se añadió piridina (355 µl, 4,4 mmol) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se diluyó con diclorometano (50 ml) y se lavó con HCl 1 M enfriado con hielo y agua, y se concentró. La cromatografía en columna de gel de sílice (tolueno - acetato de etilo 9:1) del residuo dio el éster activo **2** (359 mg, 95 %) en forma de un jarabe incoloro. Datos de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ 2,00 (m, 2H, β-CH₂), 2,33 (s, 3H, CH₃COS), 2,68 (t, 2H, J = 7,4 Hz, γ-CH₂), 2,81 (s, 4H, 2 CH₂ de succinimida), 2,96 (t, 2H, J = 7,1 Hz, α-CH₂). Datos de RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃): δ 24,7 (β-CH₂), 25,6 (CH₂ de succinimida), 27,9 (γ-CH₂), 29,7 (α-CH₂), 30,7 (CH₃COS), 168,0 (COON), 169,2 (CO de succinimida), 195,4 (CH₃COS).

Ejemplo 2. Síntesis de 4-acetilsulfanilbutirato de 4-nitrofenilo 3Esquema 2. Síntesis del reactivo enlazador 3. a: CF₃COOpNp, Et₃N.

A una solución del ácido **1** (233 mg, 1,44 mmol) (Hogg, J. Heather; Ollmann, Ian R.; Wetterholm, Anders; Andberg, Martina Blomster; Haeggstroem, Jesper; et al.; Chem. Europ. J.; EN; 4; 9; 1998; 1698-1713) y trifluoroacetato de 4-nitrofenilo (470 mg, 2 mmol) en diclorometano se añadió trietilamina (400 µl, 2,88 mmol) y la solución se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se sometió a tratamiento como se ha descrito para **2** y el éster activo **3** (385 mg, 94 %) se aisló por cromatografía en columna sobre gel de sílice (tolueno - acetato de etilo 92:8). Datos de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ 2,03 (m, 2H, β-CH₂), 2,36 (s, 3H, CH₃COS), 2,68 (t, 2H, J = 7,2 Hz, γ-CH₂), 3,01 (t, 2H, J = 7,1 Hz, α-CH₂), 7,28, 8,26 (2 d, 4H, aromáticos). Datos de RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃): δ 24,7 (β-CH₂), 28,0 (γ-CH₂), 30,7 (CH₃COS), 32,7 (α-CH₂), 122,5, 125,2, 145,3, 155,3 (C aromático), 170,4 (COO), 195,5 (CH₃COS).

Ejemplo 3. Síntesis de los ligandos 6 y 7 usando el reactivo enlazador 2 o 3



Esquema 3. Síntesis de los ligandos, a: 1) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, MeOH/THF 2) 2 o 3, Et_3N , CH_2Cl_2 ; b: $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH , Δ ; c: DTT, NaHCO_3 , Ac_2O , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$.

El nonasacárido 4 (M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, N.E. Nifantiev, "Synthesis of oligo-β(1→6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus*" Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575) (110 mg, 0,023 mmol) se disolvió en una mezcla de MeOH (3 ml), THF (6 ml) y HCl 1 M (0,2 ml) y se añadió $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (110 mg). La mezcla resultante se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 1 h. El catalizador se retiró por filtración y los disolventes se evaporaron. El residuo se disolvió en una mezcla de CH_2Cl_2 (2 ml) y DMF (1 ml) y después se añadieron el reactivo enlazador 2 (12 mg, 0,046 mmol, solución en 1 ml de CH_2Cl_2) y Et_3N (100 μl). Después de 30 minutos, la mezcla se diluyó con tolueno, se concentró y se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (tolueno/ Me_2CO , 4:1) para dar 5 (98 mg, 98 %) en forma de una espuma incolora. La introducción del enlazador se confirmó por la presencia de sus señales características en los espectros de RMN del ligando de carbohidrato protegido. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 1,88 (m, 2H, β - CH_2), 2,21 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, γ - CH_2), 2,31 (s, 3H, CH_3COS), 2,88 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, α - CH_2). Datos de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 25,7 (β - CH_2), 28,5 (α - CH_2), 30,6 (CH_3COS), 35,1 (γ - CH_2).

Una mezcla del nonasacárido protegido 5 (95 mg, 0,02 mmol), EtOH (5 ml) y $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5 ml) se agitó a la temperatura de reflujo durante 1 h y después se concentró y se sometió a cromatografía de permeación de gel (gel

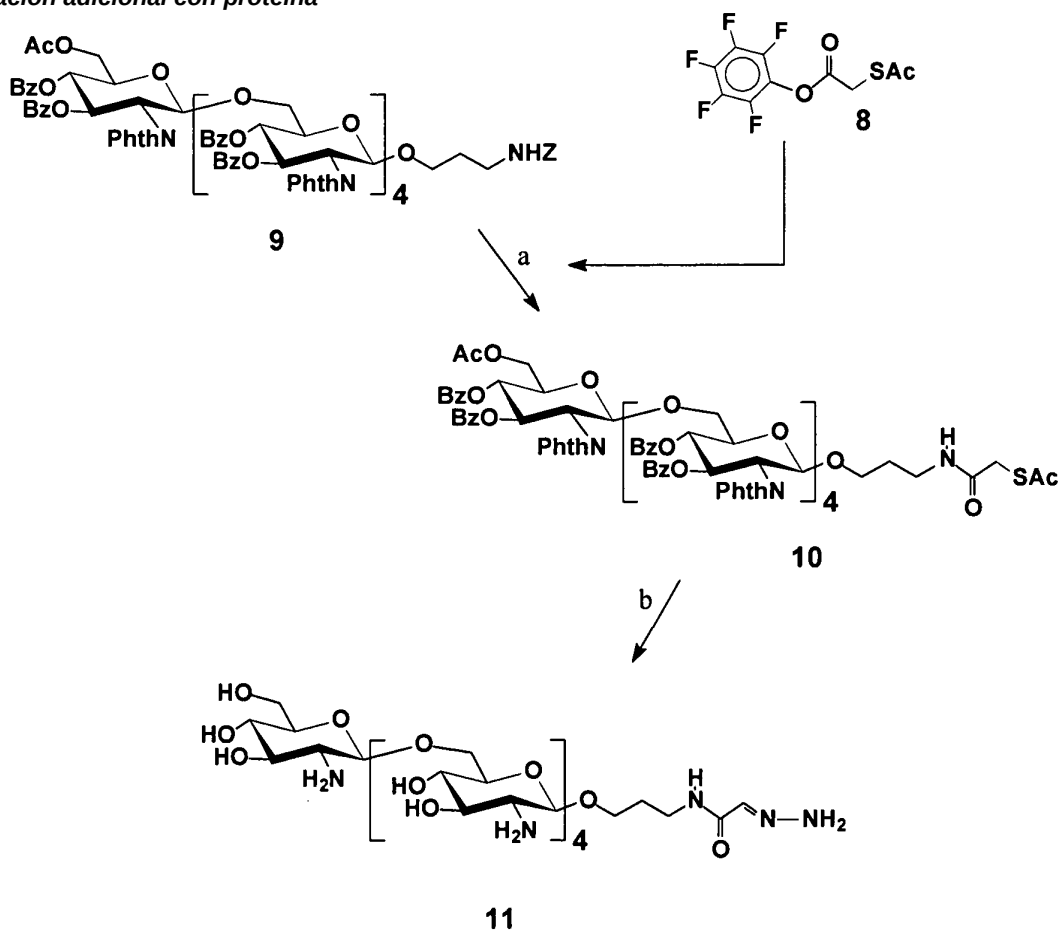
Toyopearl HW 40S de TSK, 2,5 x 40 cm) en AcOH acuoso 0,1 M para formar el nonasacárido **6** (28 mg, 86 %). Puede obtenerse el derivado de SH directamente después de la cromatografía de gel puesto que este se detecta por espectrometría de masas, pero después del almacenamiento en solución, este se convierte en el disulfuro correspondiente puesto que esto se confirmó por el experimento de RMN ^{13}C . RMN ^1H (500 MHz, D_2O): δ 1,95 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 2,32 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\gamma\text{-CH}_2\text{SH}$), 2,71 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\alpha\text{-CH}_2$). Datos de RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O): δ 29,7 ($\beta\text{-CH}_2$), 35,8 ($\gamma\text{-CH}_2\text{SH}$), 38,5 ($\alpha\text{-CH}_2$), 42,1 ($\gamma\text{-CH}_2\text{SS}$). Espectros de masas: calculados para $\text{C}_{61}\text{H}_{114}\text{N}_{10}\text{O}_{38}\text{S}$ 543,234 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, experimentales 543,243 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$.

El nonasacárido **6** (15 mg) se disolvió en una mezcla de agua/MeOH (2 ml, 1:1 v/v) y se añadieron ditiotretitol (15 mg) y NaHCO_3 (20 mg). La mezcla resultante se agitó durante 5 minutos y después se añadió anhídrido acético (100 μl) y se continuó agitando durante 30 minutos antes de evaporarse los disolventes. El producto se purificó por cromatografía de permeación de gel (gel Toyopearl HW 40S de TSK, 2,5 x 40 cm) en AcOH acuoso 0,1 M para dar el producto acetilado **7** (15 mg, 95 %). RMN ^1H (500 MHz, D_2O): δ 1,75 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 2,11 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\gamma\text{-CH}_2$), 2,43 (s, 3H, CH_3COS), 2,75 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\alpha\text{-CH}_2$). Datos de RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O): δ 25,7 ($\beta\text{-CH}_2$), 28,5 ($\alpha\text{-CH}_2$), 30,6 (CH_3COS), 35,1 ($\gamma\text{-CH}_2$). Espectros de masas: calculados para $\text{C}_{81}\text{H}_{134}\text{N}_{10}\text{O}_{48}\text{S}$ 1024,418 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, experimentales 1024,427 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

Ejemplo 4. Síntesis del ligando protegido **5** usando el reactivo enlazador **3**

El nonasacárido **4** (60 mg, 0,013 mmol) se disolvió en una mezcla de MeOH (1,5 ml), THF (3 ml) y HCl 1 M (0,1 ml) y se añadió $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (60 mg). La mezcla resultante se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 1 h. El catalizador se retiró por filtración y los disolventes se evaporaron. El residuo se disolvió en una mezcla de CH_2Cl_2 (2 ml) y DMF (1 ml) y después se añadieron el reactivo enlazador **3** (20 mg, 0,07 mmol, solución en 1 ml de CH_2Cl_2) y Et_3N (50 μl). Después de 20 h, la mezcla se diluyó con tolueno, se concentró y se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (tolueno/ Me_2CO , 4:1) para dar **5** (37 mg, 68%) en forma de una espuma incolora.

Ejemplo 5. Estudio de aplicabilidad del reactivo enlazador **8** para la preparación de ligandos para conjugación adicional con proteína

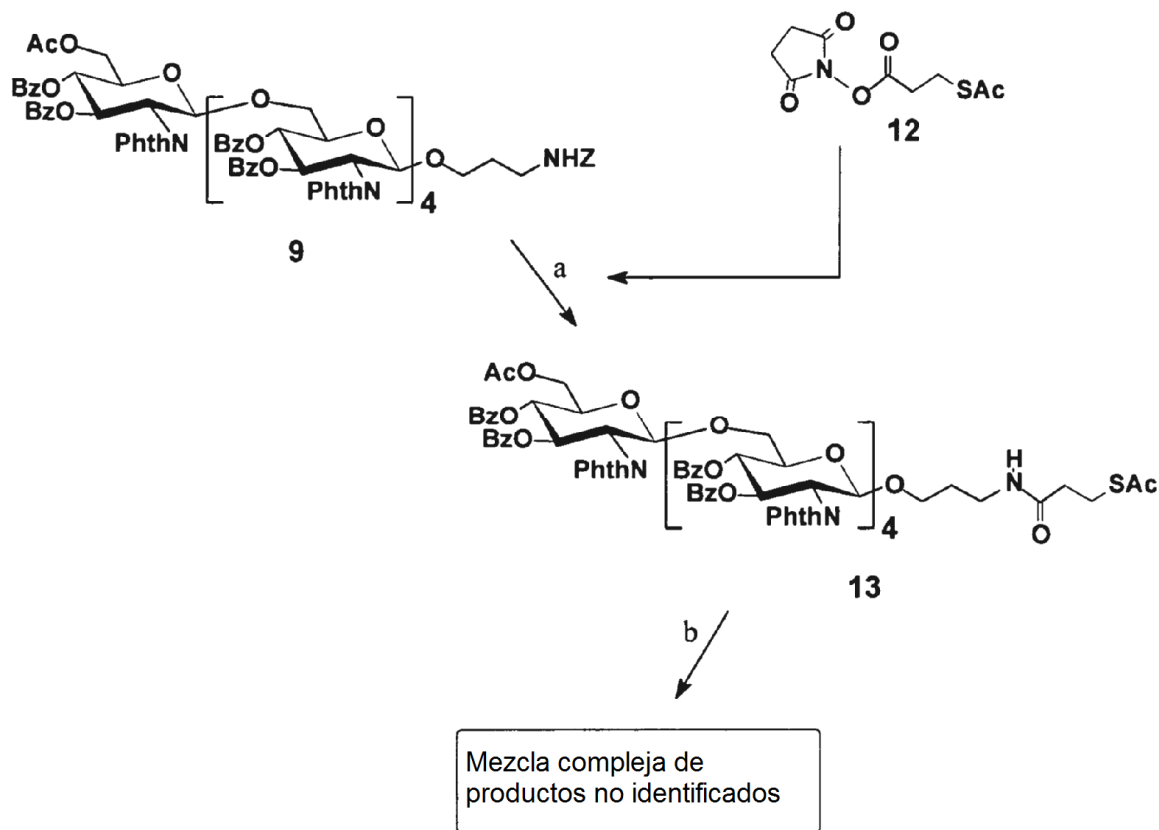


Esquema 4. Síntesis de los ligandos. a: 1) H₂, Pd(OH)₂/C, MeOH/THF 2) **8**, Et₃N, CH₂Cl₂; b: N₂H₄·H₂O, EtOH, Δ.

El pentasacárido **9** (150 mg, 0,026 mmol) (M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, N.E. Nifantiev, "Synthesis of oligo-β(1→6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of Staphylococcus aureus" Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575) se disolvió en una mezcla de MeOH (1,5 ml), THF (3 ml) y HCl 1 M (0,1 ml) y se añadió Pd(OH)₂/C (150 mg). La mezcla resultante se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 1 h. El catalizador se retiró por filtración y los disolventes se evaporaron. El residuo se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂ (2 ml) y DMF (1 ml) y después se añadieron el reactivo enlazador **8** (30 mg, 0,1 mmol, solución en 0,1 ml de CH₂Cl₂) y Et₃N (50 µl). Después de 1 h, la mezcla se diluyó con tolueno, se concentró y se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (tolueno/Me₂CO, 4:1) para dar **10** (132 mg, 89 %) en forma de una espuma incolora. Datos de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,38 (s, 3H, CH₃COS), 3,53 (s, 2H, CH₂S); Datos de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 30,2 (CH₃COS), 32,9 (CH₂S).

Una mezcla del pentasacárido protegido **10** (100 mg, 0,017 mmol), EtOH (5 ml) y N₂H₄·H₂O (0,5 ml) se agitó a la temperatura de reflujo durante 1 h y después se concentró y se sometió a cromatografía de permeación de gel (gel Toyopearl HW 40S de TSK, 2,5 x 40 cm) en AcOH acuoso 0,1 M para formar el pentasacárido **11** (32 mg, 93 %). Datos de RMN ¹H (500 MHz, D₂O): δ 7,17 (s, 1H, CH=N); Datos de RMN ¹³C (125 MHz, D₂O): δ 134,6 (C=N-NH₂), 167,4 (C(O)-CH=N). Espectros de masas: calculados para C₃₅H₆₇N₆O₂₂ 951,438 [M+H]⁺, experimentales 951,448 [M+H]⁺.

Ejemplo 6. Estudio de aplicabilidad del reactivo enlazador 12 para la preparación de ligandos para conjugación adicional con proteína

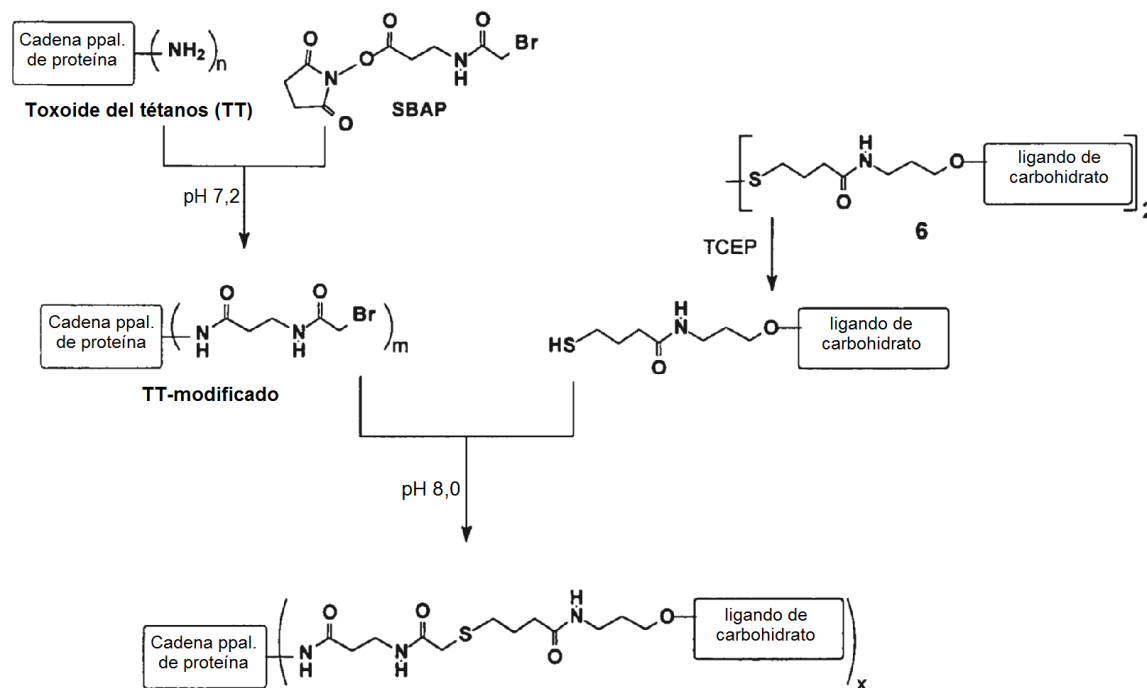


Esquema 5. Síntesis de los ligandos. a: 1) H₂, Pd(OH)₂/C, MeOH/THF 2) **12**, Et₃N, CH₂Cl₂;
b: N₂H₄·H₂O, EtOH, Δ

El pentasacárido **9** (100 mg, 0,017 mmol) (M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, N.E. Nifantiev, "Synthesis of oligo-β(1→6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of Staphylococcus aureus" Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575) se disolvió en una mezcla de MeOH (1,5 ml), THF (3 ml) y HCl 1 M (0,1 ml) y se añadió Pd(OH)₂/C (150 mg). La mezcla resultante se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 1 h. El catalizador se retiró por filtración y los disolventes se evaporaron. El residuo se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂ (2 ml) y DMF (1 ml) y después se añadieron el reactivo enlazador **12** (15 mg, 0,061 mmol, solución en 0,1 ml de CH₂Cl₂) y Et₃N (50 µl). Después de 1 h, la mezcla se diluyó con tolueno, se concentró y se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (tolueno/Me₂CO, 4:1) para dar **13** (87 mg, 85%) en forma de una espuma incolora. Datos de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,33 (s, 3H, CH₃COS), 2,52 (m, 2H, COCH₂), 3,15 (t, 2H, J 7,6, CH₂S); Datos de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 25,2 (CH₃COS), 29,2 (COCH₂), 35,9 (CH₂S).

Una mezcla del pentasacárido protegido **13** (80 mg, 0,015 mmol), EtOH (5 ml) y $N_2H_4 \cdot H_2O$ (0,5 ml) se agitó a la temperatura de reflujo durante 1 h y después se concentró y se sometió a cromatografía de permeación de gel (gel Toyopearl HW 40S de TSK, 2,5 x 40 cm) en AcOH acuoso 0,1 M para dar una mezcla compleja de productos no identificados.

Ejemplo 7. Preparación del conjugado del toxoide del tétanos con el ligando 6 - "TT-9NH₂"



Conjugado del toxoide del tétanos con el Ligando 6 ("TT-9NH₂")

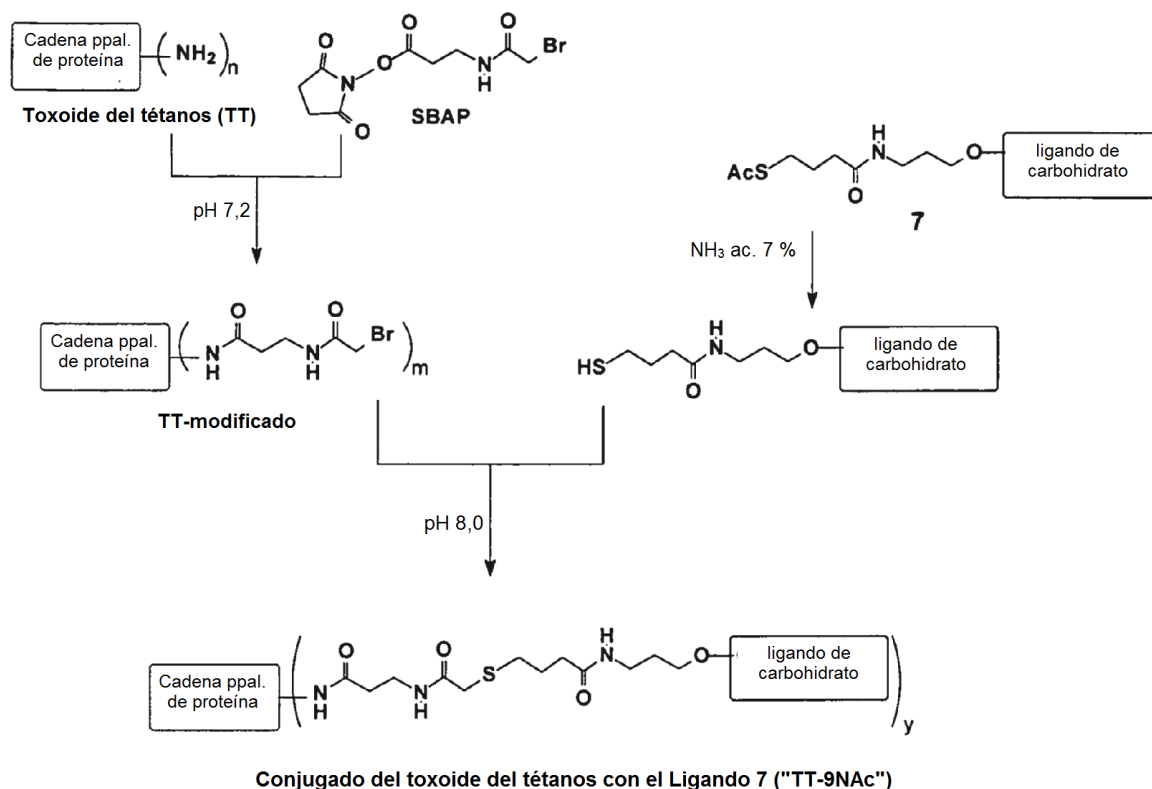
Esquema 6. Conjugación con el Ligando 6.

Etapas 1. Modificación de la proteína. El toxoide del tétanos (4 mg en 120 µl, solución madre) se diluyó con 400 µl de t pH 7,2 (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM), se añadió la solución de SBAP (2,6 mg) en DMSO (80 µl) y la mezcla se incubó durante 2 h a TA. El SBAP sin reaccionar se eliminó usando una columna PD-10 en tampón de análisis de pH 8,0 (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM), y los 3,5 ml resultantes de solución de proteína modificada se concentraron a 400 µl.

Etapas 2. Reducción de disulfuro. El Gel reductor de disulfuro TCEP (200 µl de una suspensión al 50% en agua) se centrifugó, se eliminó el exceso de agua, y se añadió el disulfuro **6** (1,5 mg en 100 µl de tampón de pH 8,0 (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, 10 mM EDTA)). Tras incubación en una bandeja rotatoria a temperatura ambiente durante 45 min, la solución del derivado de SH se separó del gel mediante centrifugación y el TCEP inmovilizado se lavó con el mismo tampón de pH 8,0 (3 x 100 µl).

Etapas 3. Conjugación. La solución del ligando obtenida en la Etapa 2 (400 µl en tampón de pH 8,0) se combinó inmediatamente con la proteína modificada (400 µl en tampón de pH 8,0, Etapa 1) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el conjugado se separó de los componentes no acoplados mediante filtración en gel en una columna preparativa Superose 6. Las fracciones que contenían conjugado TT-9NH₂ se combinaron, se concentraron y se almacenaron congeladas a -20°C.

Análisis químico del conjugado. El conjugado se analizó para determinar su contenido de oligosacáridos mediante el ensayo de la hexosamina descrito por Smith y Gilkerson (R.L. Smith y E. Gilkerson. 1979 Analytical Biochem. 98: 478-480) con los compuestos **6** como patrón y el de proteínas con el ensayo Bradford (M.M. Bradford, 1976, Analytical Biochem. 72:248 - 254). Según estos ensayos, el conjugado TT-9NH₂ contiene 74 ligandos de carbohidrato por molécula de proteína (x = 74).

Ejemplo 8. Preparación del conjugado del toxoide del tétanos con el ligando 7 - "TT-9NAC"

Esquema 7. Conjugación con el Ligando 7.

5

Etapla 1. Modificación de la proteína. TT se modificó con SBAP como se ha descrito anteriormente para el conjugado TT-9NH₂.

Etapla 2. Desprotección de S-acetilo. El nonasacárido 7 (2,1 mg) se disolvió en 200 µl de una solución acuosa al

10 7% de NH₃, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora y después se liofilizó.

Etapla 3. Conjugación. El oligosacárido liofilizado se disolvió inmediatamente en 400 µl de tampón de pH 8,0 (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, 10 mM EDTA) y se mezcló con 400 µl de solución de TT modificado en el mismo tampón. La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de este

15 tiempo, el conjugado se separó de los componentes no acoplados mediante filtración en gel en una columna preparativa Superose 6. Las fracciones que contenían conjugado IL-9NAC se combinaron, se concentraron y se almacenaron congeladas a -20°C.

Análisis químico del conjugado. El análisis se llevó a cabo de la misma forma que para el conjugado TT-9NH₂ (Ejemplo 7) y reveló que el conjugado TT-9NAC contiene 71 ligandos de carbohidrato por molécula de proteína (y =

20 71).

Ejemplo 9. Producción de anticuerpos usando conjugados de oligosacárido

Métodos. Los conejos se inmunizaron por vía subcutánea con 10 µg de polisacárido equivalente a nonaglicosamina (es decir, 9 monómeros enlazados) conjugada con el toxoide del tétanos (TT) dos veces, con una separación de una semana, con un volumen equivalente del adyuvante Specol. En la tercera semana, los conejos se inmunizaron tres veces (es decir, el lunes, miércoles y viernes) con 10 µg de PS equivalente en suero salino IV. Después de la última inmunización, los conejos se analizaron durante dos semanas y se extrajo sangre cada dos semanas. Los datos de esta presentación incorporan los resultados del primer (extracción 1) y segundo (extracción 2) suero obtenidos después de la inmunización.

Resultados. Las figuras 1A y B muestran los datos relacionados con la unión de antisueros sensibilizados contra una nona-glucosamina no acetilada (9GlcNH₂) a PNAG (A) o dPNAG (B) de *S. aureus*. El dPNAG usado en este experimento estaba acetilado en aproximadamente un 15%. Sin embargo, se entiende que el nivel de acetilación puede estar comprendido en el intervalo de 0-40%. Los datos muestran que el antisero se une de forma comparable a PNAG y dPNAG.

35

Las figuras 2A y B muestran los datos relacionados con la unión de antisueros sensibilizados contra una nona-glucosamina completamente acetilada (9GlcNAc) a PNAG o dPNAG de *S. aureus*. Los datos muestran que los antisueros se unen mejor al PNAG fuertemente acetilado que al dPNAG.

Las figuras 3A y B muestran los datos relacionados con la unión de antisueros sensibilizados contra 9GlcNAc o 9GlcNH₂ conjugados con TT a 11 GlcNAc o 11GlcNH₂ sin conjuguar. Los datos muestran que el antisuero sensibilizado contra 9GlcNAc acetilado se une mejor a 11GlcNAc acetilado de lo que lo hace el antisuero sensibilizado contra 9GlcNH₂ no acetilado. Lo contrario fue cierto para la unión a 9GlcNH₂, ya que el antisuero contra el conjugado 9GlcNH₂-TT estaba fuera de la escala para diluciones séricas de menos de 6400.

Las figuras 4 y 5 muestran los resultados usando antisueros de la extracción 1 contra *S. aureus* MN8 y dos cepas USA300. La FIG. 4 compara la destrucción de *S. aureus* MN8 (CP8) con el antisuero de conejo (denominado "extracción 1") contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 5 compara la destrucción de *S. aureus* MN8 con el antisuero de conejo (extracción 1) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). Como comparador se usó el antisuero dirigido contra dPNAG conjugado con TT. La FIG. 6 compara la destrucción de *S. aureus* LAC (NT, USA300) con el antisuero de conejo (extracción 1) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 7 compara la destrucción de *S. aureus* SF8300 (NT, USA300) con el antisuero de conejo (extracción 1) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 8 compara la destrucción de *S. aureus* LAC (NT, USA300) con el antisuero de conejo (extracción 1) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). En general, el suero sensibilizado contra 9GlcNH₂-TT demostró la mejor actividad global pero, en la mayoría de los ensayos, apenas fue algo mejor que el suero sensibilizado contra 9GlcNAc-TT.

Las figuras 9-16 muestran los datos de la destrucción que resulta del suero de la extracción 2. Se usó anti dPNAG-TT de conejo de control como comparador de las cepas MN8, SF8300 y LAC. Se usó anti dPNAG-TT de cabra como comparador para la cepa Newman (CP5), la cepa PS80 (CP8) y las cepas isogénicas Reynolds CP5, Reynolds no tipificable y Reynolds CP8.

La FIG. 9 compara la destrucción de *S. aureus* MN8 (CP8) con el antisuero de conejo (extracción 2) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 10 compara la destrucción de *S. aureus* LAC (NT, USA300) con el antisuero de conejo (extracción 2) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 11 compara la destrucción de *S. aureus* SF8300 (NT, USA300) con el antisuero de conejo (extracción 2) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 12 compara la destrucción de *S. aureus* Newman (CP5) con el antisuero de conejo (extracción 2) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 13 compara la destrucción de *S. aureus* PS80 con el antisuero de conejo (extracción 2) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 14 compara la destrucción de *S. aureus* Reynolds (CP5) con el antisuero de conejo (extracción 2) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 15 compara la destrucción de *S. aureus* Reynolds (no tipificable) con el antisuero de conejo (extracción 2) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT). La FIG. 16 compara la destrucción de *S. aureus* Reynolds (CP8) con el antisuero de conejo (extracción 2) contra la oligoglucosamina de 9-meros completamente acetilada o no acetilada conjugada con el toxoide del tétanos (TT).

En general, se consiguió un grado de destrucción más elevado usando el antisuero sensibilizado contra los conjugados de oligosacárido que con el antisuero sensibilizado contra dPNAG-TT. La destrucción de las cepas LAC y SF8300 fue mejor con el suero de la extracción 2 en comparación con el suero de la extracción 1 incluso aunque las curvas de unión según ELISA sean similares. Mediante la extracción 2, se observó una importante diferencia en la destrucción usando el antisuero sensibilizado contra 9GlcNH₂ en comparación con la lisis usando el suero sensibilizado contra 9GlcNAc.

Ejemplo 10. Antisuero de conejo y destrucción opsónica de *E. coli*.

Los anticuerpos de conejo del antisuero de conejo posterior a la inmunización (como se ha descrito anteriormente) mediaron en la destrucción opsónica de dos cepas de *E. coli* que habían mostrado anteriormente producir PNAG, pero no en una tercera cepa que carecía de los genes *the pga* que codifican las enzimas biosintéticas de PNAG en *E. coli* (FIG. 16A).

Ejemplo 11. Modelos de abscesos en piel de ratón.

Las figuras 17, 18 y 19 muestran los resultados de un estudio in vivo usando un modelo de abscesos en piel de ratón y un estímulo con la cepa LAC de *S. aureus* (USA300). El antisuero sensibilizado contra 9GlcNH₂ demostró una

eficacia protectora contra una infección cutánea de *S. aureus* LAC (USA300). El Grupo 1 (marcado como 9GlcNH₂-TT) recibió 0,2 ml de antisero 9GlcNH₂-TT (extracción 2) por vía intraperitoneal 24 horas antes de la infección. El Grupo 2 (marcado como NRS) recibió 0,2 ml de suero de conejo normal (NRS) 24 horas antes de la infección. Los ratones se infectaron con 2×10^4 UFC (FIG. 17), 2×10^5 UFC (FIG. 19), o 2×10^6 UFC (FIG. 20) en una inyección subcutánea de 100 µl (por absceso) con perlas microdex (10 g/ml). La cepa LAC de *S. aureus* se hizo crecer en TSB durante la noche, a continuación se lavó y se añadió a las perlas microdex antes de la administración. Después de 72 horas, cada absceso se extirpó, se resuspendió en 1 ml de TSB, se homogeneizó, se diluyó y a continuación 100 µl de homogenado se sembraron en placas junto con diluciones en serie. El límite inferior de detección fue de 10 UFC/absceso. Las figuras 17, 18 y 19 muestran que el número de UFC por absceso se redujo en gran medida en los ratones que recibieron el antisero 9GlcNH₂-TT, en comparación con el suero normal de conejo. La FIG. 20 resume los resultados de las FIG. 18-20 que muestran que para cada dosis de *S. aureus*, los ratones que recibieron 9GlcNH₂ estuvieron mejor protegidos contra el estímulo de *S. aureus*.

Las figuras 21 y 22 muestran los resultados de dos estudios in vivo utilizando el mismo modelo de abscesos en piel de ratón así como los procedimientos descritos en el párrafo anterior, pero las cepas de estímulo son otras dos cepas más de *S. aureus*, MN8 y Newman. Los ratones se infectaron con 1×10^6 UFC de la cepa MN8 (FIG. 21) o 4×10^6 UFC de la cepa Newman (FIG. 22) en una inyección subcutánea de 100 µl (por absceso) con perlas microdex (10 g/ml). Las figuras 21 y 22 muestran que el número de UFC por absceso se redujo en gran medida en los ratones que recibieron el antisero 9GlcNH₂-TT, en comparación con el suero normal de conejo.

La FIG. 23 muestra la incapacidad del antisero sensibilizado contra la vacuna de conjugado 9GlcNH₂-TT para reducir significativamente ($P > 0,05$) las UFC/absceso de las cepas MN8Δica y NewmanΔica de *S. aureus*. Estas dos cepas tenían el locus genético *ica* eliminado, y ya no podían sintetizar el polisacárido superficial PNAG. En ausencia del antígeno PNAG, el anticuerpo del oligosacárido 9GlcNH₂ no pudo proporcionar ninguna inmunidad protectora contra las infecciones de la piel por *S. aureus*.

Ejemplo 12. Efecto protector contra peritonitis por *E. coli*.

La eficacia protectora del anticuerpo contra 9GlcNH₂-TT se estudió en un modelo de peritonitis letal por infección de *E. coli*. Este anticuerpo protegió a todos los ratones inmunizados contra la infección causada por dos aislados de *E. coli* PNAG positivos (Tabla 1 - Cepas UTI J y P) mientras que todos los controles que recibieron NRS no sobrevivieron. No hubo protección transmitida por el anticuerpo contra el antisero 9GlcNH₂-TT frente a la cepa H de *E. coli* PNAG negativa.

Tabla 1. Eficacia protectora del anticuerpo contra 9GlcNH₂-TT frente a peritonitis letal causada por *E. coli*.

Cepa de <i>E. coli</i> estímulo	Número de supervivientes del total de ratones		valor P (prueba exacta de Fisher)
	Anti-9GlcNH ₂ TT	NRS ^a	
J (PNAG ⁺)	8/8	0/8	0,0002
P (PNAG ⁺)	8/8	0/8	0,0002
H (PNAG ⁻)	0/8	0/8	1,0

^a NRS: suero normal de conejo

Discusión de resultados

Usando las vacunas de conjugado GlcNH₂-TT sintético no acetilado, se ha descubierto que, de acuerdo con la invención, no se necesitan acetatos para generar elevados niveles de anticuerpos opsonicos y protectores en los animales, sino que la conjugación de una molécula tan pequeña como GlcNH₂ de cinco monómeros es suficiente para una respuesta inmunitaria sólida, y que estos anticuerpos se unen fácilmente a PNAG N-acetilado, dPNAG poco acetilado, y a los oligosacáridos no acetilados. Por tanto, estos anticuerpos protectores se unirán a PNAG natural independientemente de su composición, incluido su nivel de acetilación.

La invención contempla además la producción de vacunas que comprenden múltiples antígenos que incluyen los oligosacáridos no acetilados de la invención. La síntesis de GlcNH₂-oligómeros con un enlazador de extremo reductor que contiene un grupo sulfhidrilo reactivo sugiere que las vacunas dirigidas a microbios que fabrican PNAG se pueden fabricar más eficazmente conjugando los GlcNH₂-oligosacáridos con proteínas microbianas que actúan como factores de virulencia y antígenos de la vacuna. Por ejemplo, la proteína LcrV de *Y. pestis* es una diana para la protección contra la peste (Garmory et al. Vaccine 22:947-57 (2004); Overheim et al. Infect. Immun. 73:5152-9 (2005); Quenee et al. Infect. Immun. 76:2025-2036 (2008)) pero se conocen variantes serológicas de esta proteína entre las cepas de *Y. pestis* que circulan en Asia Central (Anisimov et al. Clin. Microbiol. Rev. 17:434-464 (2004)), lo que posibilita que dichas cepas pudieran evadir la inmunidad generada por un único componente de vacuna LcrV. Puesto que *Y. pestis* expresa PNAG, la conjugación de GlcNH₂-oligómeros con LcrV potenciaría la cobertura protectora de la vacuna contra la peste. Este enfoque para la producción de vacunas es atractivo, ya que la versión sintética de los oligosacáridos dPNAG se puede producir de forma bastante barata y, de forma importante, no serán

ningún otro contaminante microbiano.

En su conjunto, estos hallazgos indican que los oligómeros de pequeño tamaño de glucosamina con enlace beta(1→6) conjugada con una proteína vehículo puede inducir niveles elevados de anticuerpos opsonicos que también son protectores contra infecciones cutáneas de *S.aureus* y peritonitis letal debido a *E. coli*.

EQUIVALENTES

Aunque en el presente documento se han descrito e ilustrado varias realizaciones inventivas, los expertos en la materia imaginarán fácilmente otros varios medios y/o estructuras para realizar la función y/o para obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en el presente documento, y cada una de estas variaciones y/o modificaciones se considera comprendida en el alcance de las realizaciones inventivas descritas en el presente documento. Más generalmente, los expertos en la materia apreciarán rápidamente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritos en el presente documento se consideran ilustrativos y que en realidad, los parámetros, dimensiones, materiales, y/o configuraciones, dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para las que se utilice(n) las enseñanzas de la invención. Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, usando nada más que la experimentación habitual, muchos equivalentes de las realizaciones inventivas específicas descritas en el presente documento. Debe por tanto entenderse que las anteriores realizaciones se presentan solamente a título ilustrativo y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y de los equivalentes de las mismas, las realizaciones de la invención se pueden llevar a la práctica de otra forma que la descrita y reivindicada específicamente. Las realizaciones inventivas de la presente divulgación se dirigen de forma individual a cada rasgo, sistema, artículo, material, kit, y método descrito en el presente documento. Además, cualquier combinación de dos o más de dichos rasgos, sistemas, artículos, materiales, kits, y/o métodos, si estos rasgos, sistemas, artículos, materiales, kits, y/o materiales no son mutuamente incoherentes, está incluido dentro del alcance inventivo de la presente divulgación.

Todas las definiciones, tal como se definen y utilizan en el presente documento, deberán considerarse superiores a las definiciones del diccionario, definiciones en los documentos incorporados por referencia, y/o los significados habituales de los términos definidos.

Todas las referencias, patentes y solicitudes de patente divulgadas en el presente documento se incorporan por referencia con respecto a la materia sujeto para la que se cita cada una, que, en algunos casos, puede abarcar la totalidad del documento.

Los artículos indefinidos "un" y "uno", tal como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, salvo que se indique otra cosa de forma evidente, se deberán entender con el significado de "al menos uno".

La expresión "y/o", tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, se deberá entender que significa "cualquiera o ambos" de los elementos en cuestión, es decir, elementos que se presente conjuntamente en algunos casos y se presentan disjuntamente en otros casos. Múltiples elementos listados con "y/o" deberán tomarse de la misma forma, es decir, "uno o más" de los elementos así unidos. Pueden estar opcionalmente presentes otros elementos distintos a los elementos identificados específicamente en la cláusula "y/o", tanto relacionados como no relacionados con dichos elementos específicamente identificados. De este modo, como ejemplo no limitativo, una referencia a "A y/o B", cuando se usa junto con una redacción abierta como en "que comprende" puede referirse, en una realización, solamente a A (incluyendo opcionalmente otros elementos además de B); en otra realización, solamente a B (incluyendo opcionalmente otros elementos además de A); en otra realización adicional, a ambos A y B (incluyendo opcionalmente otros elementos); etc.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "o" deberá entenderse con el mismo significado que "y/o" tal como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan elementos de una lista, "o" o "y/o" deberán interpretarse como inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero incluyendo más de uno, de un número o lista de elementos y, opcionalmente, elementos adicionales no relacionados. Solamente los términos que indiquen claramente lo contrario, tal como "solo uno de" o "exactamente uno de", o, cuando se usa en las reivindicaciones, "que consiste en", se referirá a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o" tal como se usan en el presente documento, se deberá interpretar solamente como que indica alternativas exclusivas (es decir "uno o el otro pero no ambos") cuando va precedido de términos de exclusividad, tales como "cualquiera", "uno de", "solo uno de", o "exactamente uno de". "Que consiste esencialmente en", cuando se usa en las reivindicaciones, tendrá su significado habitual cuando se utiliza en el campo de la ley de patentes.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, deberá entenderse que significa al menos un elemento seleccionado entre uno cualquiera o más de los elementos de la lista de elementos, pero sin incluir necesariamente al menos uno de todos y cada uno de los elementos específicamente enumerados dentro de la lista de elementos y no excluyendo cualesquiera combinaciones de la lista de elementos. Esta definición también permite que los elementos puedan estar opcionalmente presentes de forma diferente a los elementos específicamente identificados dentro de la lista de

elementos a la que se refiere la expresión "al menos uno", tanto relacionados como no relacionados con dichos elementos específicamente identificados. De este modo, como ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, de forma equivalente, "al menos uno de A o B," o, de forma equivalente "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en una realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, A, sin B presente (e incluyendo

5 opcionalmente otros elementos además de B); en otra realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, B, sin A presente (e incluyendo opcionalmente otros elementos además de A); en otra realización adicional, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, A, y al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, B (e incluyendo opcionalmente otros elementos); etc.

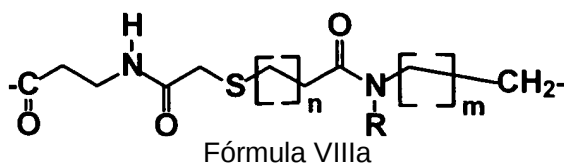
10 Deberá entenderse que, salvo que se indique otra cosa de forma evidente, en cualesquiera métodos reivindicados en el presente documento que incluyen más de una etapa o acción, el orden de las etapas o acciones del método no está necesariamente limitado al orden en el que se citan las etapas o acción del método.

15 En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva, todas las frases de transición tales como "que comprende", "que incluye", "que contiene", "que tiene", "que contienen", "que implica", "que mantiene", "compuesto de", o similares, han de considerarse como abiertas, es decir, significan incluyendo, pero sin limitación. Solamente las frases "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" se considerarán frases de transición cerradas o semicerradas, respectivamente, como se define en el United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Sección 2111.03.

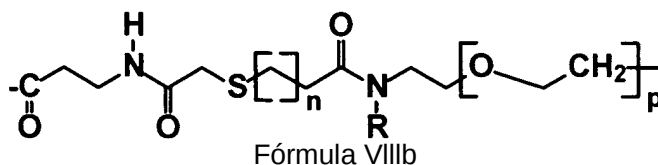
20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un conjugado de oligosacárido-vehículo que comprende un oligosacárido conjugado a un vehículo a través de un enlazador que es



o

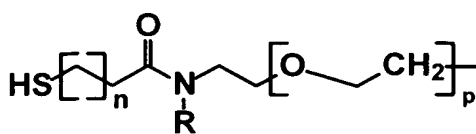
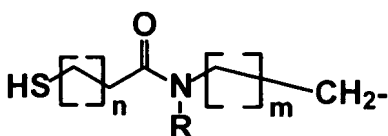


en las que n es mayor de 1, m es un número seleccionado de 1 a 10, p es un número seleccionado de 1 a 20 y R es H o un grupo alquilo, y en donde el enlazador está O-enlazado al oligosacárido y N-enlazado al vehículo, y en donde la composición es capaz de estimular una respuesta inmunitaria.

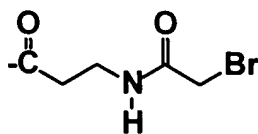
2. La composición de la reivindicación 1, que además comprende

- (a) un vehículo farmacéuticamente aceptable,
- (b) un adyuvante, o
- (c) un agente antibacteriano.

3. Un método para sintetizar un conjugado de oligosacárido-vehículo que comprende hacer reaccionar un conjugado de oligosacárido con un enlazador de Fórmulas IXa o IXb



en las que n es mayor de 1, m es un número seleccionado de 1 a 10, p es un número seleccionado de 1 a 20 y R es H o un grupo alquilo, con un vehículo que tiene un grupo amino modificado, siguiendo una reacción con un compuesto de Fórmula X



para producir un oligosacárido conjugado con un compuesto vehículo a través de un enlazador que tiene una estructura de Fórmulas VIIIa o VIIIb.

4. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 3, en donde el conjugado de oligosacárido-

vehículo tiene una proporción de oligosacárido a vehículo de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1 o 100:1.

5. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 3, en donde el vehículo es

- (a) un péptido,
- (b) una proteína, o
- (c) toxoide del tétanos.

6. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 3, en donde el oligosacárido es

- (a) glucosamina β -1-6 enlazada,
- (b) glucosamina β -1-6 enlazada que tiene una longitud de 2-20 monómeros,
- (c) glucosamina β -1-6 enlazada que tiene una longitud de 5-11 monómeros,
- (d) glucosamina β -1-6 enlazada que tiene una longitud de 7, 9 u 11 monómeros, o
- (e) glucosamina β -1-6 enlazada que está un 0-40 % acetilada.

7. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 4-6, o un conjugado de oligosacárido-vehículo sintetizado por un método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, para su uso como medicamento.

8. La composición o el conjugado de oligosacárido-vehículo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, para usarse con

- (a) un adyuvante, o
- (b) un agente antibacteriano.

9. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 4-6, o un conjugado de oligosacárido-vehículo sintetizado por un método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección en un sujeto que tiene o que está en riesgo de desarrollar una infección causada por una especie bacteriana que produce PNAG.

10. La composición o el conjugado de oligosacárido-vehículo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la infección es

- (a) una infección por *Staphylococcus*,
- (b) una infección por *Staphylococcus aureus*,
- (c) una infección por *Staphylococcus epidermidis*, o
- (d) una infección por *E. coli*, una infección por *Y. pestis*, una infección por *Y. enterocolitica*, una infección por *Y. pseudotuberculosis*, una infección por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, una infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, una infección por *Bordetella pertussis*, una infección por *B. parapertussis*, una infección por *B. bronchiseptica*, una infección por *Acinetobacter*, una infección por *Burkholderia*, una infección por *Stenotrophomonas maltophilia*, una infección por *Shigella* o una infección por *Klebsiella*.

11. La composición o el conjugado de oligosacárido-vehículo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el sujeto

- (a) está en riesgo de exposición a *Staphylococcus*, o
- (b) ha estado expuesto a *Staphylococcus*.

12. La composición o el conjugado de oligosacárido-vehículo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el sujeto

- (a) es un ser humano, o
- (b) no es humano.

13. La composición o el conjugado de oligosacárido-vehículo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, a usar con un adyuvante.

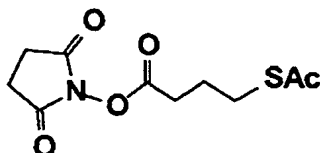
14. Un método para obtener células productoras de anticuerpos, comprendiendo el método:

administrar, a un sujeto no humano, la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 4-6, o un conjugado de oligosacárido-vehículo sintetizado por un método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en una cantidad eficaz para producir anticuerpos específicos de PNAG, y recolectar células productoras de anticuerpos del sujeto no humano, en donde el método no es un método de tratamiento del cuerpo animal mediante cirugía o terapia.

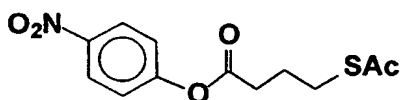
15. Un método para producir anticuerpos, comprendiendo el método:

obtener células productoras de anticuerpos de acuerdo con el método de la reivindicación 14;
fusionar las células productoras de anticuerpos del sujeto no humano con células de mieloma, y
recolectar los anticuerpos producidos a partir de un subclón de fusión.

16. Un compuesto de Fórmula III o un compuesto de Fórmula IV,

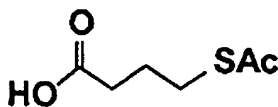


Fórmula III (4-acetilsulfanil butirato de succinimidilo)



Fórmula IV (4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo)
en las que Ac es un grupo acetilo.

17. Un método para sintetizar 4-acetilsulfanil butirato de succinimidilo (Fórmula III) o 4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo (Fórmula IV), comprendiendo el método
hacer reaccionar ácido 4-acetilsulfanilbutírico (Fórmula V)



Fórmula V

en la que Ac es un grupo acetilo, con trifluoroacetato de succinimidilo (CF_3COOSu) o trifluoroacetato de N-nitrofenilo (CF_3COOpNp) para producir 4-acetilsulfanil butirato de succinimidilo (Fórmula III) o 4-acetilsulfanil butirato de para-nitrofenilo (Fórmula IV), respectivamente.

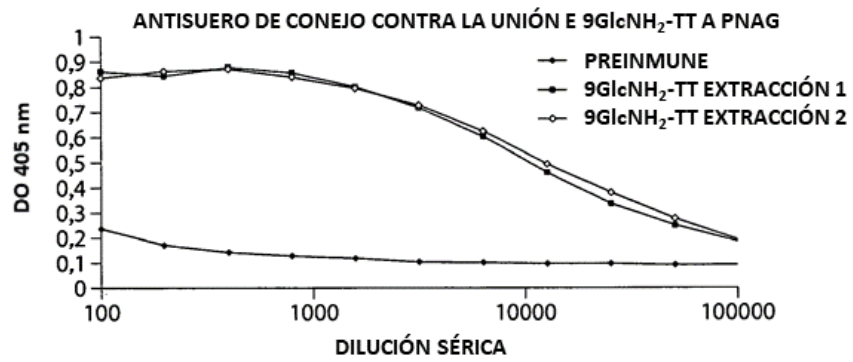


Fig. 1A

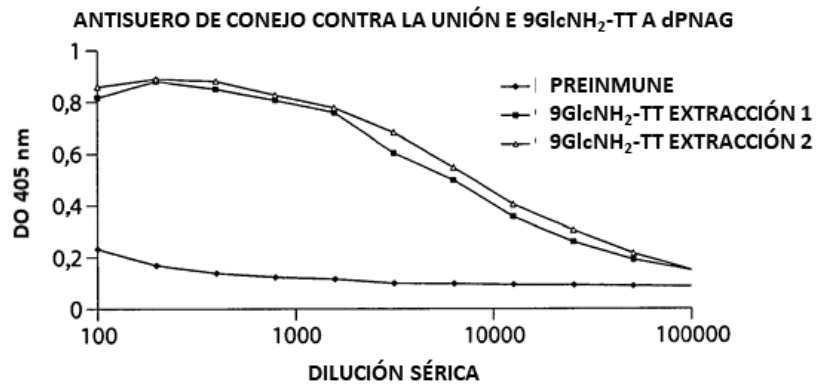


Fig. 1B

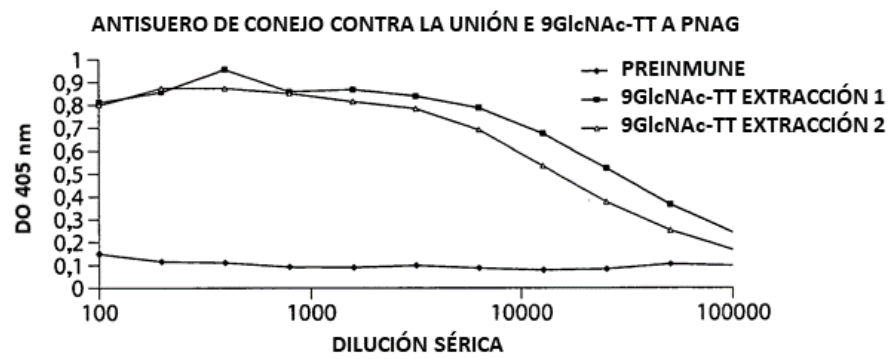


Fig. 2A

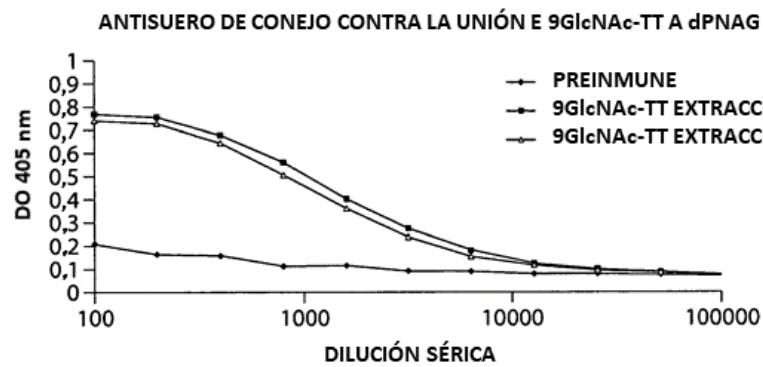


Fig. 2B

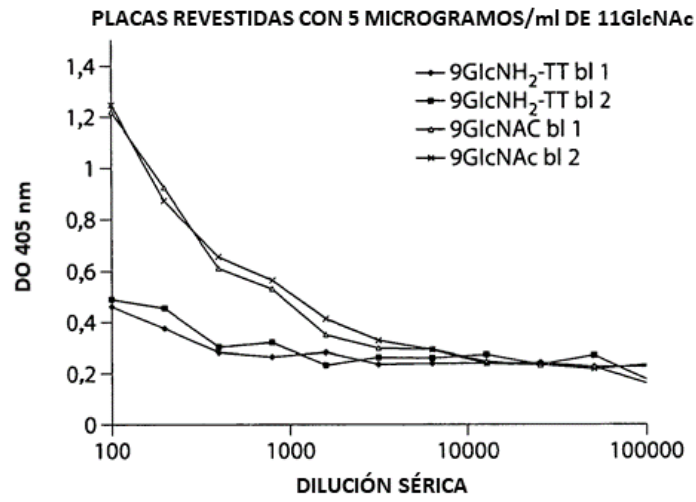


Fig. 3A

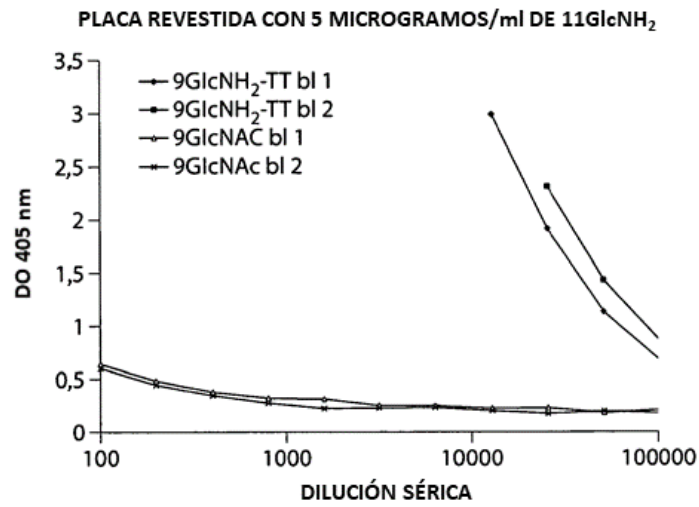


Fig. 3B

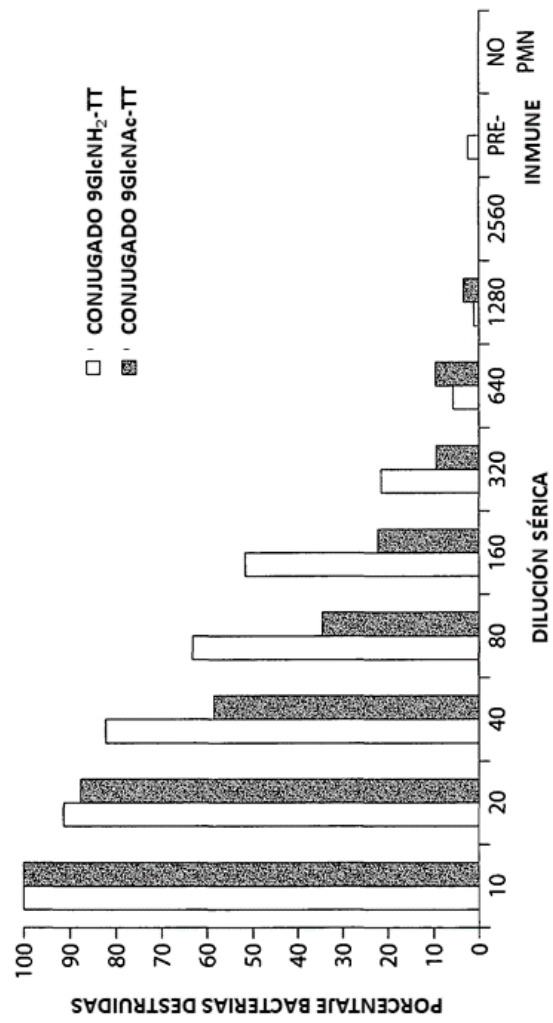


Fig. 4

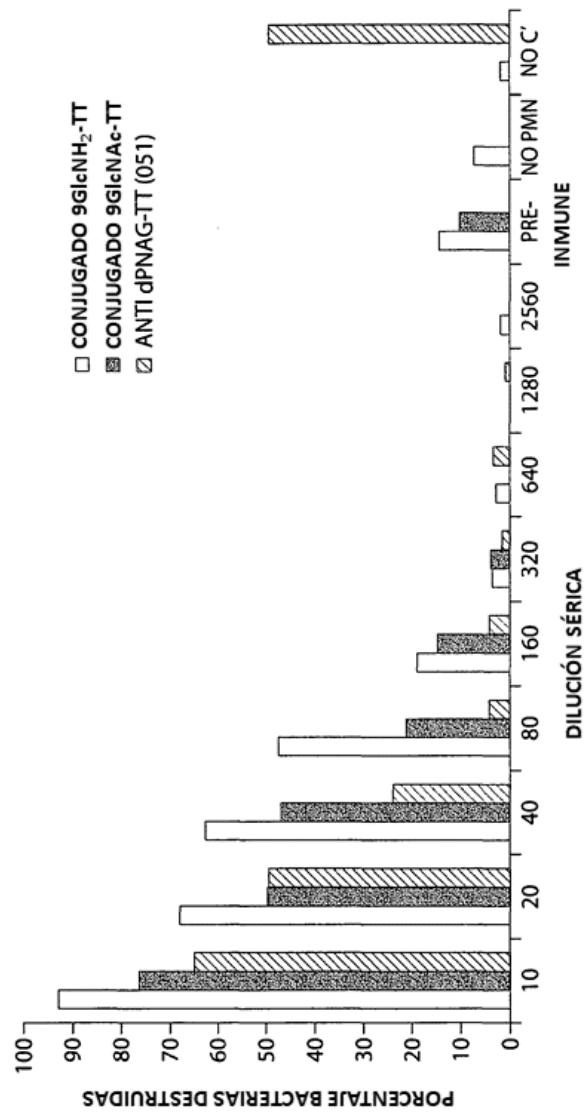


Fig. 5

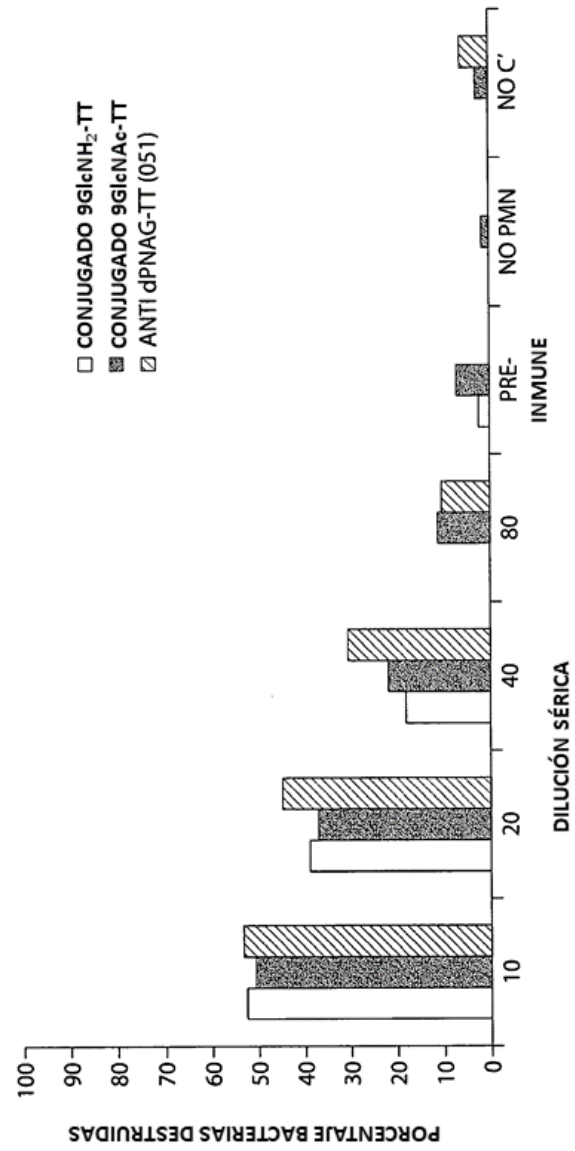


Fig. 6

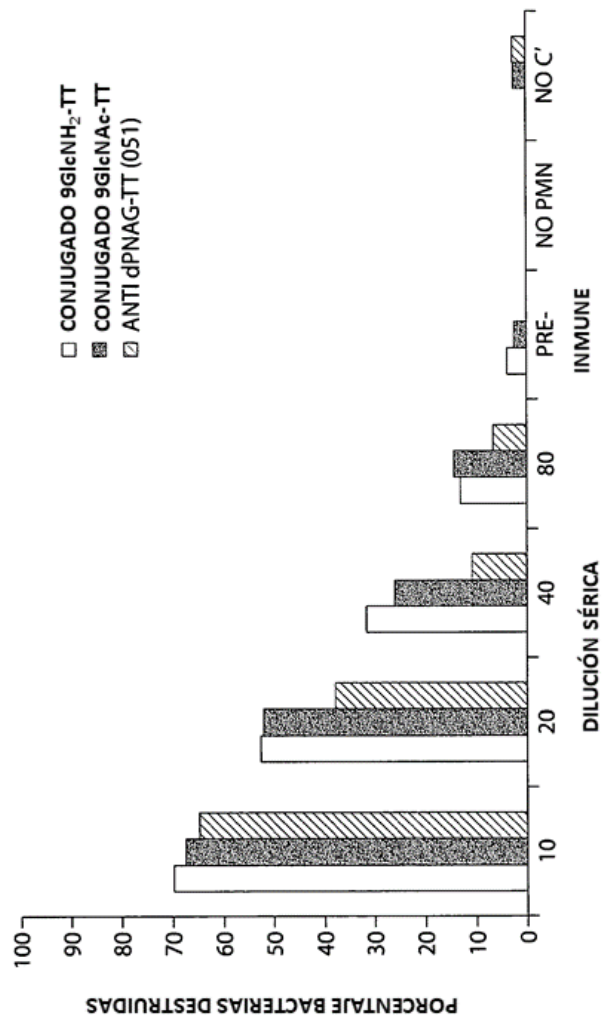


Fig. 7

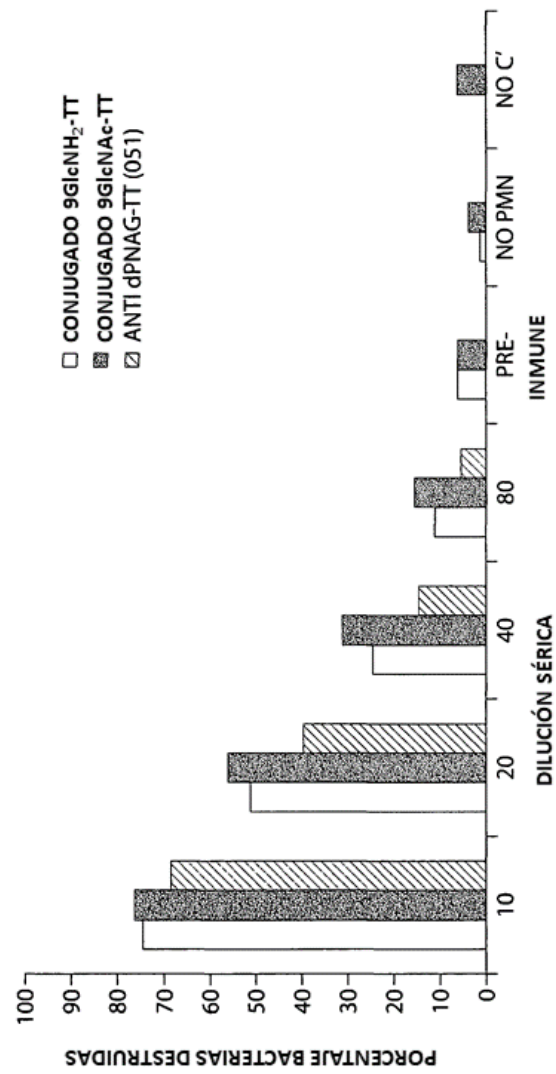


Fig. 8

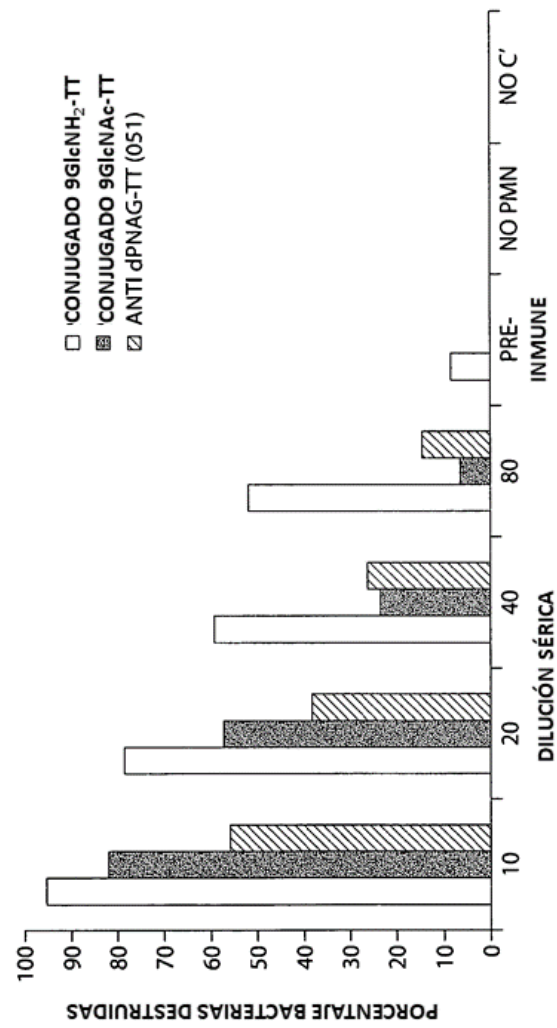


Fig. 9

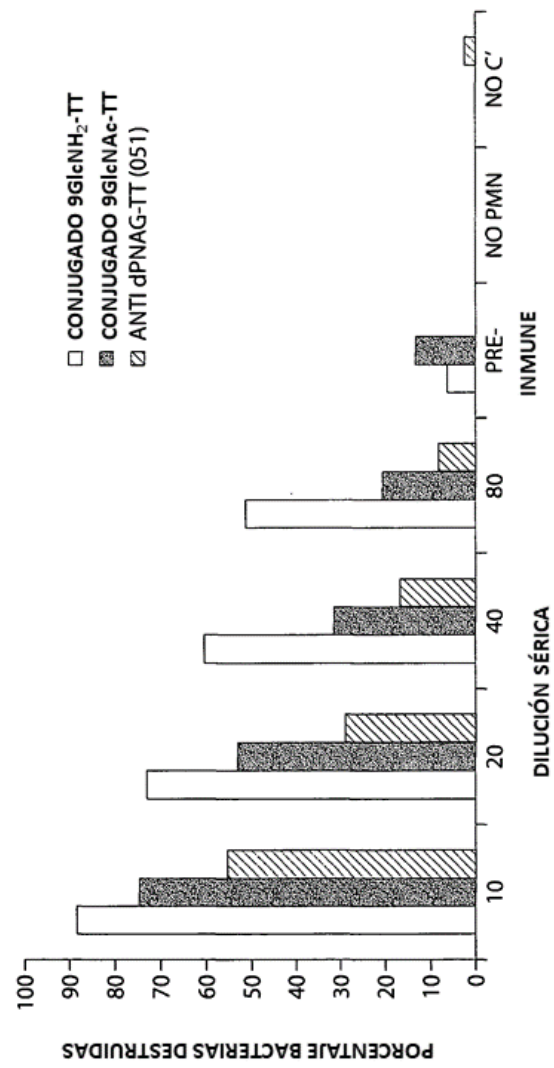


Fig. 10

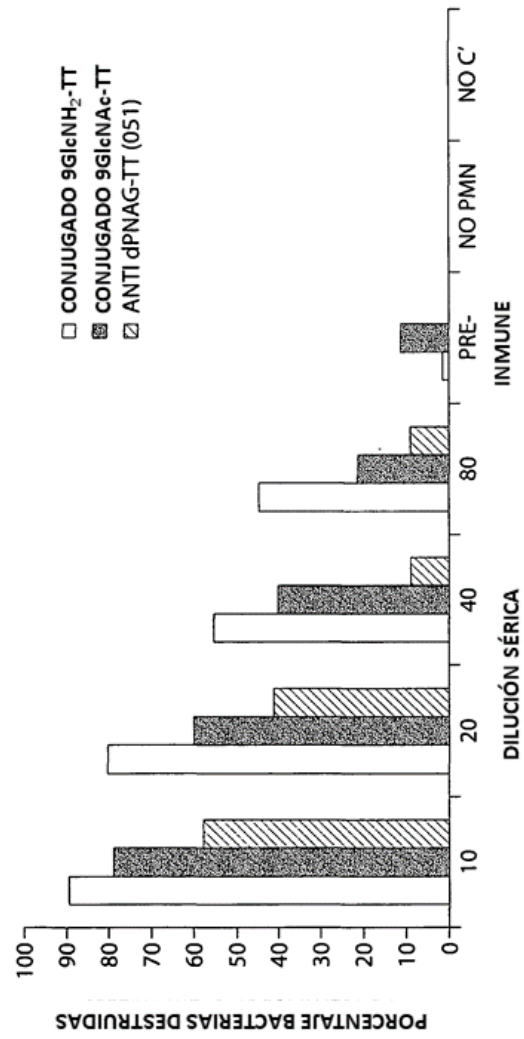


Fig. 11

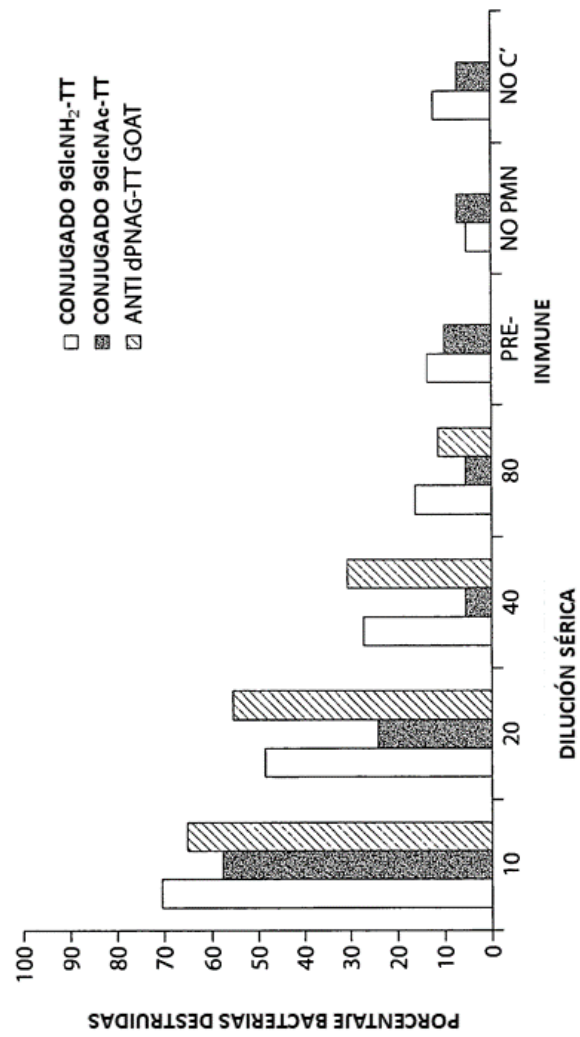


Fig. 12

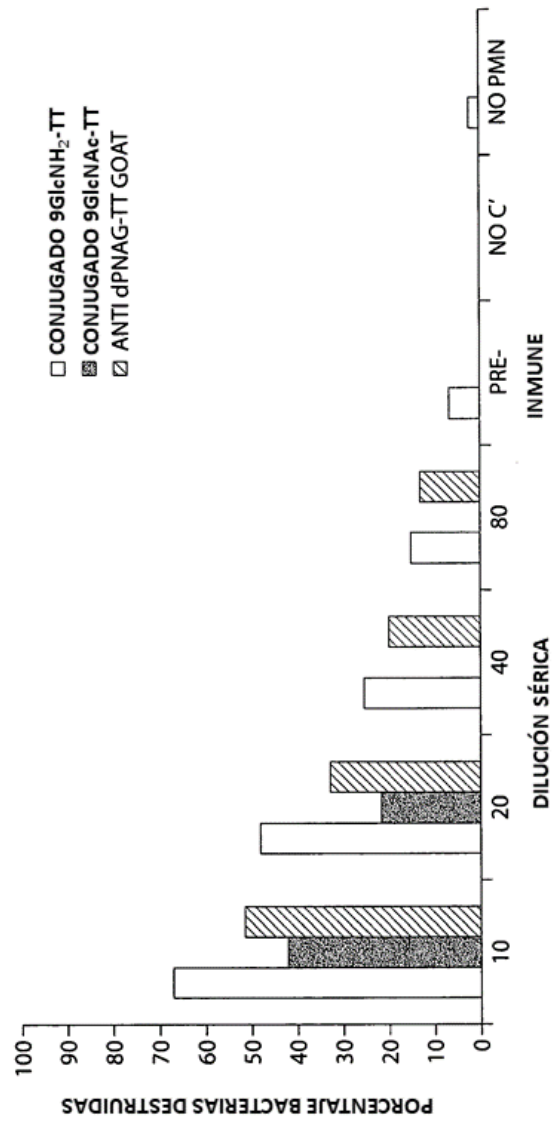


Fig. 13

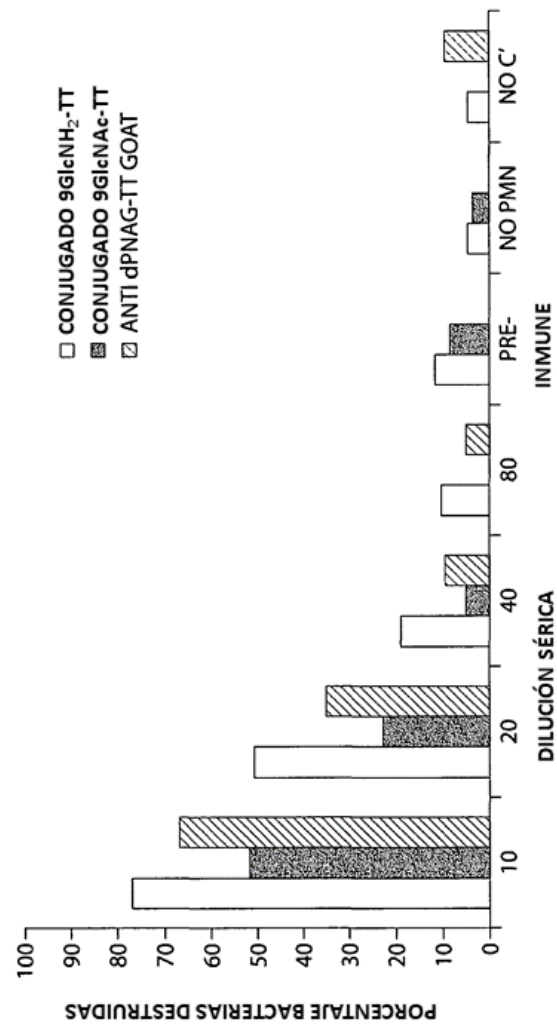


Fig. 14

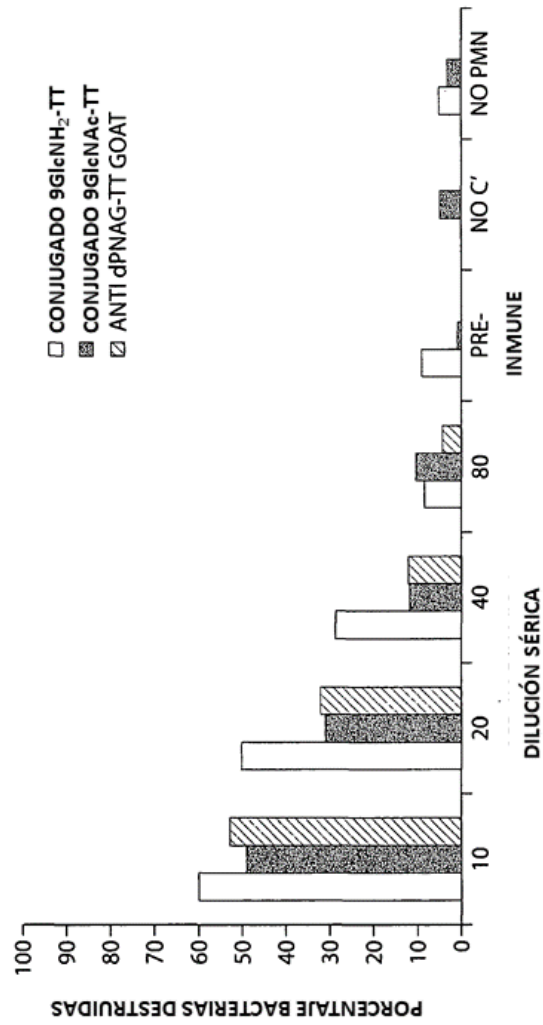


Fig. 15

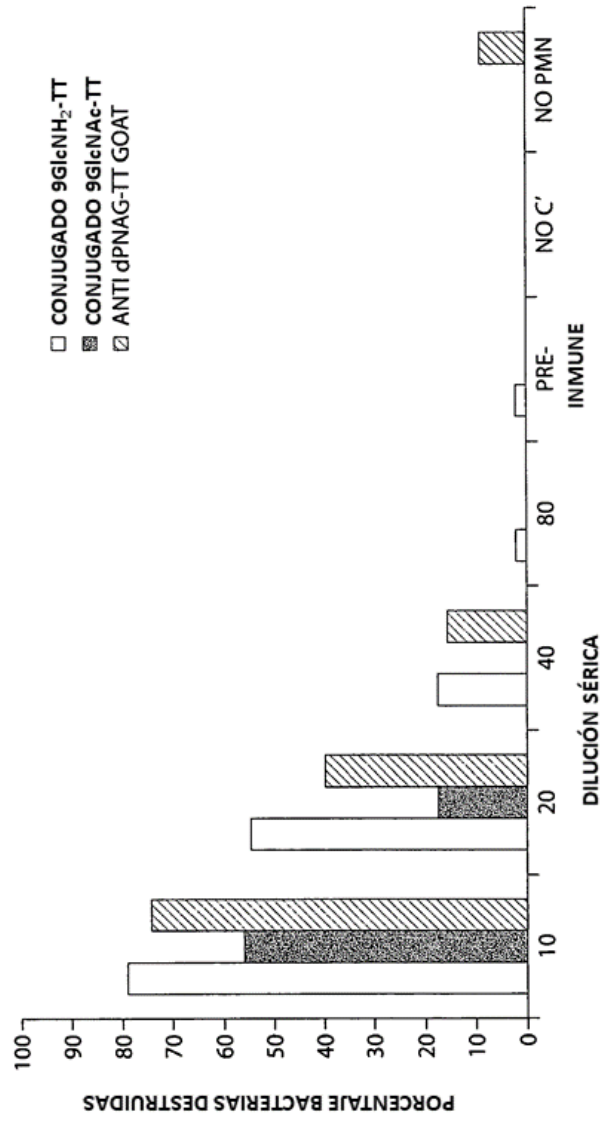


Fig. 16

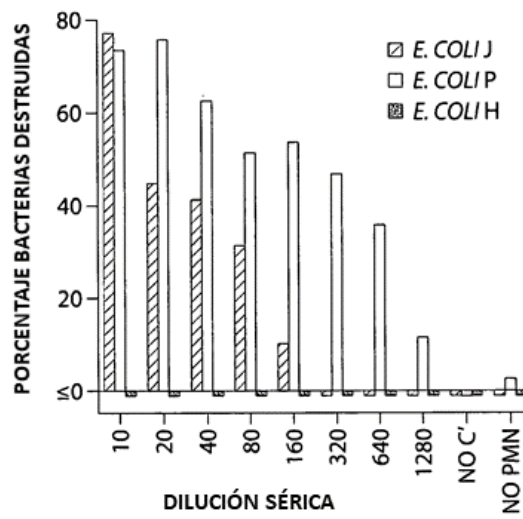


Fig. 16A

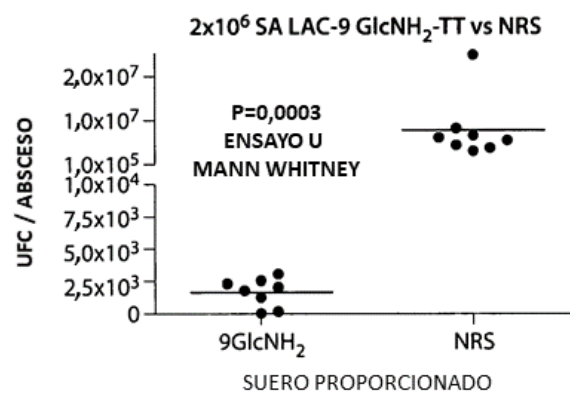
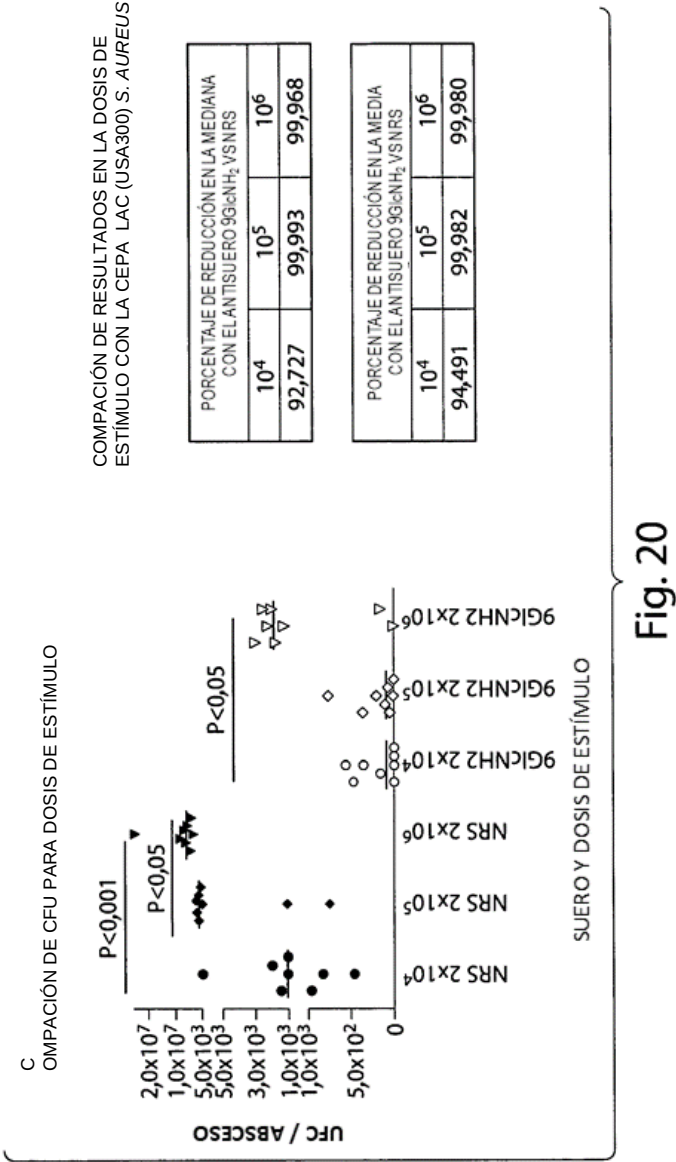


Fig. 19



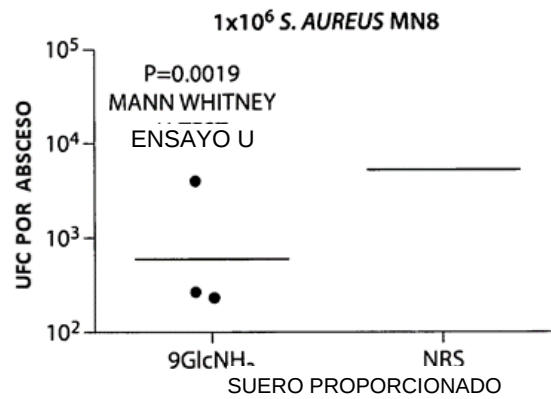


Fig. 21

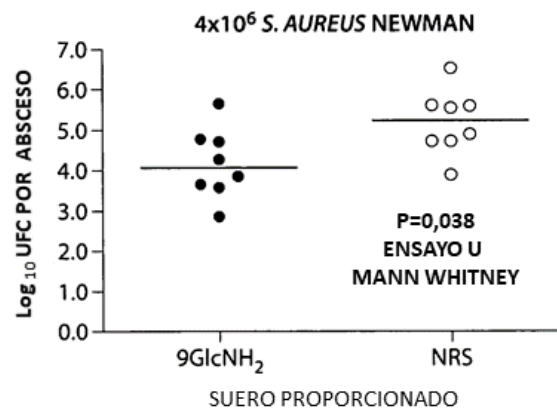


Fig. 22

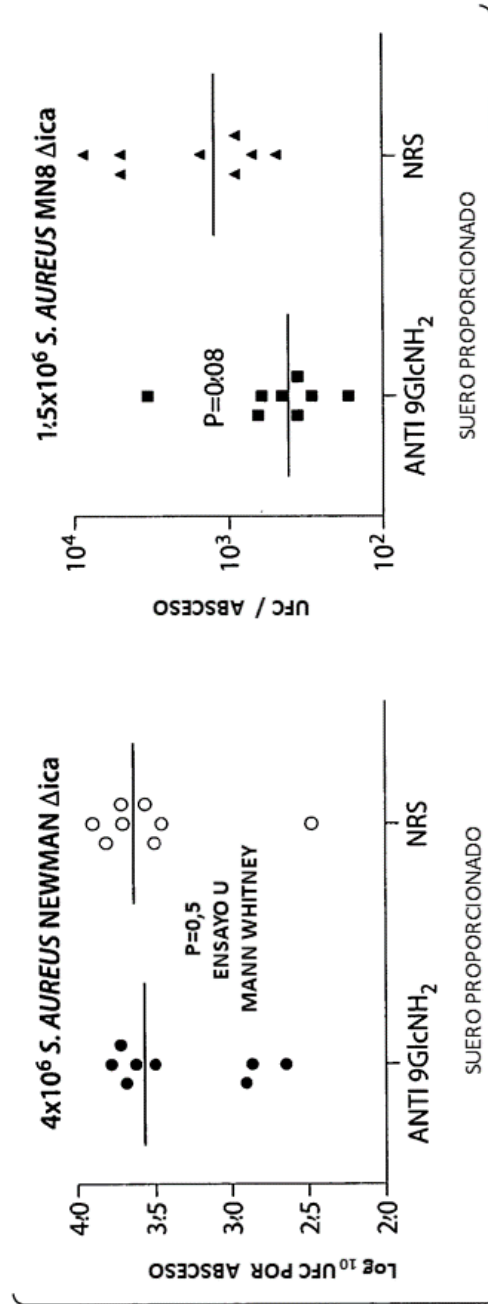


Fig. 23