

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 526**

51 Int. Cl.:

C07K 1/13	(2006.01)	C07K 7/02	(2006.01)
C07H 13/00	(2006.01)	C07C 271/22	(2006.01)
C07C 317/24	(2006.01)	C07D 229/02	(2006.01)
C07C 237/06	(2006.01)	C07D 257/08	(2006.01)
C07C 247/04	(2006.01)	A61K 47/64	(2007.01)
C07D 209/42	(2006.01)		
C07C 13/45	(2006.01)		
C07K 5/083	(2006.01)		
C07K 5/072	(2006.01)		
C07K 5/062	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2014 PCT/US2014/046409**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15006728**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2014 E 14748350 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3019515**

54 Título: **Modificaciones de proteínas quimioenzimáticas específicas para lisina utilizando transglutaminasa microbiana**

30 Prioridad:

11.07.2013 US 201361845273 P
23.06.2014 US 201462016044 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2020

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

USERA, AIMEE;
ROBINSON, ZACHARY y
COBB, JENNIFER

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 756 526 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

Modificaciones de proteínas quimioenzimáticas específicas para lisina utilizando transglutaminasa microbiana

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere por lo general a un método novedoso para introducir grupos modificadores en una proteína. En particular, la presente invención se refiere a la derivación selectiva de residuos de lisina en proteínas utilizando una reacción mediada por transglutaminasa microbiana quimioenzimática para modificar proteínas y métodos para su preparación y uso.

10 Antecedentes

Es bien sabido que las propiedades y características de las proteínas se pueden modificar conjugando grupos a la proteína. Por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 4 179 337 divulgó proteínas conjugadas a polietilén- o polipropilenglicoles. Por lo general, dicha conjugación requiere generalmente que algún grupo funcional en la proteína reaccione con otro grupo funcional en un grupo de conjugación. Se han utilizado grupos amino tales como el grupo amino N terminal o el grupo ϵ -amino en los residuos de lisina combinados con reactivos de acilación adecuados para este fin. A menudo se desea o se requiere controlar la reacción de conjugación, tal como dónde se unen los compuestos de conjugación a la proteína y controlar cuántos grupos de conjugación se unen. Esto a menudo se denomina especificidad o selectividad.

La modificación de proteínas con especificidad por un sitio es un desafío desde hace ya tiempo en las técnicas farmacéutica y biotecnológica. Los métodos clásicos a menudo dan lugar a un marcaje inespecífico (p. ej., marcaje con Lys NHS) o requieren modificaciones (p. ej., marcaje con Cys maleimida o aminoácidos artificiales). Además, el repertorio de reacciones químicas selectivas, sin embargo, es muy limitado. Una alternativa es introducir, mediante métodos recombinantes, aminoácidos artificiales especiales que tengan una reactividad única y a continuación explotar esta reactividad en la derivación adicional. Otra alternativa es el uso de enzimas que reconocen rasgos estructurales y funcionales de la proteína a modificar. Un ejemplo de esto es el uso de transglutaminasa microbiana (mTGasa) para modificar selectivamente residuos de Gln en la hormona del crecimiento. Otros documentos divulgan el uso de transglutaminasa para alterar las propiedades de proteínas fisiológicamente activas. Remítase, p. ej., a los documentos EP 950 665, EP 785 276 y Sato, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 54, 487-504 (2002), que divulgan la reacción directa entre proteínas que comprenden al menos un PEG funcionalizado con amina y Gln o ligandos similares en presencia de transglutaminasa, remítase también a Wada en *Biotech. Lett.*, 23, 1367-1372 (2001), que divulga la conjugación directa de P-lactoglobulina con ácidos grasos por medio de transglutaminasa. La reacción catalizada por la transglutaminasa es una reacción de transamidación en la que la amida primaria del residuo de glutamina se convierte en una amida secundaria a partir de una amina primaria presente en la mezcla de reacción.

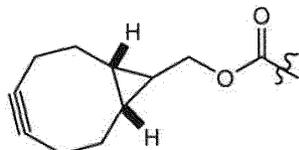
La derivatización selectiva de proteínas continúa siendo una tarea muy difícil; la derivatización de lisinas en una proteína mediante acilación es un proceso incluso más inherentemente no selectivo. Por tanto, en la actualidad no existe ningún método eficiente para la derivatización selectiva de residuos de lisina. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de métodos para derivatizar selectivamente residuos de aminoácidos tales como lisina en proteínas o polipéptidos.

45 Compendio

En un aspecto, se divulga un método para modificar una proteína. El método permite modificaciones con selectividad por un sitio. El método incluye proporcionar una proteína diana que tenga al menos un residuo de lisina; poner en contacto la proteína diana con un compuesto modificador que tenga la fórmula $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$ en presencia de una transglutaminasa microbiana para formar una proteína modificada;

donde x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1;

R¹ es



55 W se selecciona entre: alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado o polietilenglicol que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 000 uma;

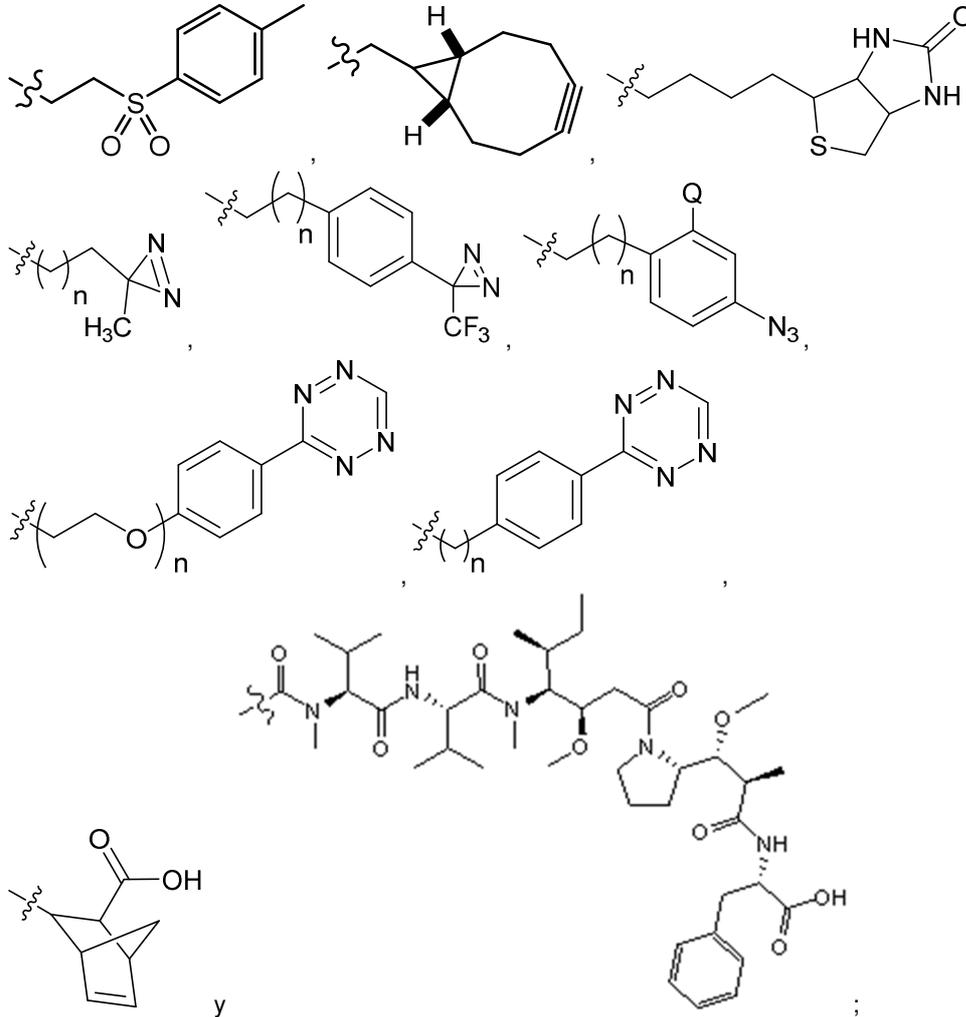
A está ausente o se selecciona entre -O-, -NH- y -S-;

B está ausente o se selecciona entre -O-, -C(O)-, -NH-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, -NHC(O)O-,

-OC(O)NH-, -OC(O)O-, -C=N(OH)-, -S(O₂)-, -NHS(O₂)-, -S(O₂)NH-, -S(O)-,

60 -NHS(O)-, -S(O)NH-; -C(O)O-, -OC(O)-, -S-, =NH-O-, =NH-NH- y =NH-N(alquilo C₁-C₂₀)-;

R² se selecciona del grupo constituido por: un ácido graso, (alquil C₁-C₃)-N₃ lineal o ramificado, ciclooctinilo, polisacárido, -CH(OCH₃)₂,



5

cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 6;
cada Q se selecciona entre H y -NO₂.

10 En algunas realizaciones, el método también incluye controlar el ambiente de pH de la proteína diana a un pH superior a 7; y poner en contacto la proteína modificada con una molécula que tiene un residuo de cisteína.

15 En algunas realizaciones, la molécula que tiene el residuo de cisteína es N⁵-((R)-1-((carboximetil)amino)-3-mercapto-1-oxopropan-2-il)-L-glutamina.

20 En algunas realizaciones, la transglutaminasa microbiana es transglutaminasa microbiana T1 de Ajinomoto. En algunas realizaciones, la proteína es una proteína portadora. En algunas realizaciones, la proteína es CRM₁₉₇. En algunas realizaciones, la proteína se selecciona entre: toxina bacteriana, fragmentos de toxina bacteriana, toxinas bacterianas detoxificadas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

En algunas realizaciones, el método incluye hacer reaccionar el grupo R₁ con un agente biointeractivo o un agente analítico.

25 En algunas realizaciones, el método incluye hacer reaccionar el grupo R² con un agente biointeractivo o un agente analítico. En algunas realizaciones, el agente analítico es una marca. En algunas realizaciones, el método incluye detectar la marca.

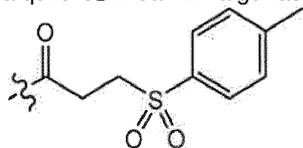
30 En otro aspecto, también se divulgan conjugados preparados mediante los procesos divulgados. En otro aspecto, se divulgan proteínas terapéuticas preparadas mediante los procesos divulgados. En otro aspecto, se divulgan agentes de imagen preparados mediante los procesos divulgados. En otro aspecto, se divulgan herramientas de marcaje preparadas mediante los procesos divulgados.

En otro aspecto, se divulgan compuestos de la fórmula $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ donde R^1 , x , y , A , W , B , R^2 y z tienen los significados descritos en la presente. Además, R^2 puede ser un fluoróforo.

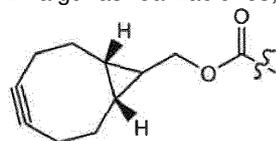
5 En algunas realizaciones, x es 1.

En algunas realizaciones, y es 1 y z es 0. En algunas realizaciones, donde y es 1 y z es 1.

10 En algunas realizaciones, W se selecciona entre alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado. En algunas realizaciones, W es alquilo C_2 lineal. En algunas realizaciones, R^2 es



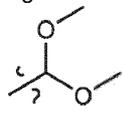
En algunas realizaciones, x es 0, y es 1 y R^1 es

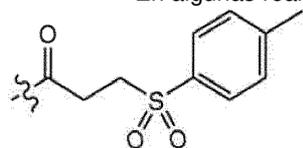


15 En algunas realizaciones, y es 0 y z es 1. En algunas realizaciones, y es 1 y z es 1.

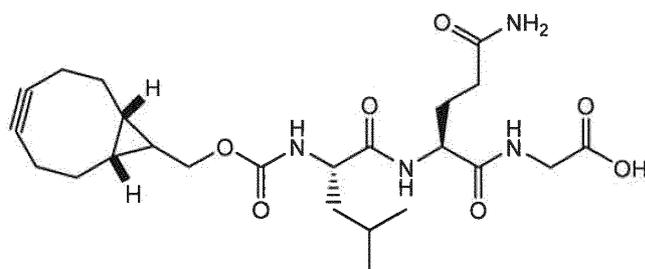
20 En algunas realizaciones, W es alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado. En algunas realizaciones, W es alquilo C_2 lineal. En algunas realizaciones, W es alquilo C_5 lineal. En algunas realizaciones, W es polietilenglicol lineal o ramificado que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 3000 uma. En algunas realizaciones, W es polietilenglicol lineal que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 uma.

En algunas realizaciones, R^2 es (alquil C_1-C_3)- N_3 lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R^2 es (alquil C_2)- N_3 . En algunas realizaciones, R^2 es ciclooctinilo. En algunas realizaciones, R^2 es

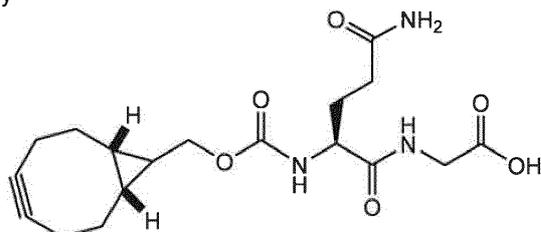
25  En algunas realizaciones, R^2 es



En algunas realizaciones, R^2 es un fluoróforo. En algunas realizaciones, el fluoróforo se selecciona entre: alexa 647, alexa 750, alexa 488, Cy5, Cy7, rhodamina y fluoresceína. En algunas realizaciones, el fluoróforo es de la fórmula:



y



5 En algunas realizaciones, se divulga un conjugado de un compuesto donde el conjugado incluye una proteína conjugada y un compuesto divulgado en la presente. En algunas realizaciones, la proteína conjugada es CRM₁₉₇. En algunas realizaciones, la proteína conjugada es GBS₈₀.

10 En algunas realizaciones, se divulga una vacuna que comprende un conjugado divulgado en la presente.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es un esquema sintético que representa la adición de un grupo modificador de proteínas que reacciona con una proteína (CRM₁₉₇) catalizada por transglutaminasa microbiana.

15 La Figura 2 es una electroforesis en gel SDS-Page que caracteriza la conjugación de polisacárido MenA con CRM₁₉₇ utilizando un compuesto de la invención.

La Figura 3 es una electroforesis en gel SDS-Page que caracteriza la conjugación con selectividad por un sitio de polisacárido antigénico GBS₈₀ con CRM₁₉₇ utilizando un compuesto de la invención, donde el carril 1 es MW, el carril 2 es GBS₈₀-K-N₃, el carril 3 es GBS₈₀-K-N₃/PSV 1 mg de proteína, el carril 4 es GBS₈₀-K-N₃/PSV 1 mg de proteína, y el carril 5 es GBS₈₀-K-N₃/PSV 1 mg de proteína.

20 La Figura 4 es una electroforesis en gel SDS-Page que caracteriza la reacción resultante de un polisacárido antigénico GBS₈₀ conjugado con CRM₁₉₇ utilizando un compuesto de la invención, donde el carril 1 es MW, el carril 2 es GBS₈₀-K-N₃, el carril 3 es GBS₈₀-K-N₃/PSII 1 mg de proteína, el carril 4 es GBS₈₀-K-N₃/PSII 1 mg de proteína, y el carril 5 es GBS₈₀-K-N₃/PSII 1 mg de proteína.

25 La Figura 5 muestra los resultados de un inmunoensayo ELISA para la determinación de los valores de Ig contra antígeno de polisacárido GBS II, donde los resultados de ELISA de IgG anti PSII y de supervivencia a una dosis de 1,0 ug de PS.

La Figura 6 muestra los resultados de un inmunoensayo ELISA para la determinación de los valores de Ig contra antígeno de polisacárido GBS V, donde los resultados de ELISA de IgG anti PSV y de supervivencia a una dosis de 30 1,0 ug de PS.

La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo de opsonofagocitosis para el uso de cepas de GBS.

Descripción detallada

35 La presente invención aborda las necesidades mencionadas anteriormente proporcionando un método para introducir compuestos modificadores en una proteína diana de una forma selectiva mediante reacción con un compuesto modificador, a la vez que se utilizan métodos químicos convencionales. El método se representa de forma general en la Figura 1. Un residuo de lisina de una proteína diana (por ejemplo, CRM₁₉₇) reacciona con un residuo de glutamina (Gln) de un compuesto modificador de fórmula (I): R¹-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R²)_z. El producto resultante es una proteína que tiene uno o más grupos capaces de una funcionalización química adicional.

45 En un aspecto, un proceso para modificar una proteína incluye: (a) formar un complejo activado entre una proteína auxiliar y un compuesto modificador mediante acción catalítica de transglutaminasa microbiana; (b) transferir el compuesto modificador desde el complejo activado hasta una proteína diana, con lo cual se crea una proteína modificada. Por tanto, una «proteína modificada», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína o polipéptido que se ha modificado selectivamente mediante adición de un compuesto modificador utilizando transglutaminasa microbiana.

En algunas realizaciones, el método incluye una reacción catalizada por transglutaminasa de una proteína diana que tiene al menos dos residuos de lisina con un compuesto modificador. El compuesto modificador es una proteína que contiene glutamina de la fórmula (I): $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$.

5 En este proceso, un complejo de acilo activado se forma haciendo reaccionar el residuo de glutamina en el compuesto modificador con transglutaminasa microbiana con el fin de unir el compuesto modificador. En una realización, el compuesto modificador se transfiere mediante acilación a un residuo de lisina en la proteína diana. En una realización, R^1 y R^2 son sustituyentes deseados, donde al menos uno de ellos tiene un grupo químico que es adecuado para una modificación adicional. Por tanto, el proceso implica una reacción con transglutaminasa microbiana con el fin de
10 modificar selectivamente un residuo de lisina en una proteína diana.

Tal como se utiliza en la presente, el término «uma» es una abreviatura para unidades de masa atómica denominadas también frecuentemente unidades Dalton.

15 Tal como se utiliza en la presente, el término «polipéptido» se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, ya sea producido natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos se denominan comúnmente «péptidos». Se pretende que el término «péptido» indique una secuencia de dos o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, donde dichos aminoácidos pueden ser naturales o artificiales. El término engloba los términos polipéptidos y proteínas, que pueden estar constituidos por dos o más péptidos que se mantienen unidos mediante interacciones covalentes tales como,
20 por ejemplo, puentes de cisteína o interacciones no covalentes.

Una «proteína» es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos tales como grupos carbohidrato. Algunos carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a una proteína por la célula en la que la se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente por lo que respecta a sus estructuras de esqueleto de aminoácidos; los sustituyentes tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, pero aún así pueden estar presentes. Una proteína o polipéptido codificado por una molécula de ADN que no es del hospedador es una proteína o polipéptido «heterólogo».
25

Un «polipéptido aislado» es un polipéptido que está esencialmente exento de componentes celulares tal como impurezas de carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Habitualmente, un preparado de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma muy purificada, es decir, al menos aproximadamente un 80% puro, al menos aproximadamente un 90% puro, al menos aproximadamente un 95% puro, más de un 95% puro tal como un 96%, 97% o 98% o más puro, o más de un 99% puro. Una forma de mostrar que un preparado proteico particular contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una única banda a continuación de una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) del preparado proteico y una tinción del gel con azul brillante de Coomassie. Sin embargo, el término «aislado» no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas tales como dímeros o, como alternativa, formas glicosiladas o derivatizadas.
30

Los términos «amino terminal» y «carboxilo terminal» se utilizan en la presente para indicar posiciones dentro de los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se utilizan con referencia a una secuencia o porción particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia en posición carboxilo terminal respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se sitúa próxima al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.
35

Un «agente biointeractivo», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un resto o compuesto orgánico que evoca una respuesta biológica cuando se introduce en un tejido o célula vivos. Los ejemplos de agentes biointeractivos incluyen antígenos, toxinas, proteínas terapéuticas y similares. Los agentes biointeractivos pueden ser moléculas de bajo peso molecular y macromoléculas.
40

Un «agente analítico», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un resto o compuesto orgánico que se puede detectar mediante métodos instrumentales para caracterizar cualitativa o cuantitativamente el material al cual el agente analítico está unido o asociado de otro modo. Algunos ejemplos de dichos agentes analíticos incluyen marcas, por ejemplo, fluoróforos o radiomarcas.
45

Tal como se utiliza en la presente, el término «alquilo» es un grupo alquilo C_1-C_{45} que es lineal o ramificado. En algunas realizaciones, el alquilo es de C_1-C_{20} . En algunas realizaciones, el alquilo es de C_1-C_{12} . En algunas realizaciones, el alquilo es de C_1-C_6 . Cuando alquilo se define como un grupo tal como W en las fórmulas I y II discutidas en la presente, se debería entender que el grupo también se puede conocer como alquileo de modo que haya una sustitución con un grupo adyacente o dos sustituciones entre dos grupos adyacentes.
50

Tal como se utiliza en la presente, el término «polietilenglicol» o «PEG» se refiere a un compuesto poliéter con una subunidad repetitiva $(O-CH_2-CH_2)_n$ que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80
55

000 uma, donde n es un número entero que representa el número de subunidades éter repetidas. Cuando polietilenglicol se define como un grupo tal como W en las fórmulas I y II discutidas en la presente, se debería entender que hay una sustitución con un grupo adyacente en cuyo caso puede haber un grupo alcohol libre en un extremo o dos sustituciones entre dos grupos adyacentes.

5

Transglutaminasa

Tal como se ha mencionado anteriormente, se debe utilizar un catalizador para unir covalentemente el compuesto modificador a la proteína diana. El catalizador debe ser una transglutaminasa microbiana (también denominada indistintamente en la presente «mTGasa»). El catalizador también se conoce como proteína-glutamina-γ-glutamilttransferasa de fuentes microbianas y cataliza la reacción de transferencia de acilo entre el grupo γ-carboxiamido de un residuo de glutamina (Gln) en una proteína o una cadena de proteína y el grupo ε-amino de un residuo de lisina (Lys) o varias alquilaminas.

La transglutaminasa a utilizar en los métodos de la presente invención se puede obtener a partir de varios orígenes microbianos sin ninguna limitación particular. Algunos ejemplos de transglutaminasas microbianas útiles incluyen transglutaminasas tales como de *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* y *Streptomyces griseocarneum* (todas divulgadas en el documento U.S. 5 156 956) y *Streptomyces lavendulae* (divulgada en el documento U.S. 5 252 469) y *Streptomyces ladakanum* (JP2003199569). Cabe destacar que los miembros del anterior género *Streptoverticillium* se incluyen ahora en el género *Streptomyces* [Kaempfer, *J.Gen.Microbiol.*, 137, 1831-1892, 1991]. Otras transglutaminasas microbianas útiles se han aislado a partir de *Bacillus subtilis* (divulgada en el documento U.S. 5 731 183) y de varios *Myxomycetes*. Otros ejemplos de transglutaminasas microbianas útiles son aquellos divulgados en el documento WO 96/06931 (p. ej., transglutaminasa de *Bacillus lydicus*) y el documento WO 96/22366.

25

Compuestos modificadores

Los compuestos modificadores que se pueden utilizar en los métodos divulgados son proteínas que contienen glutamina de las fórmulas generales: (I): R¹-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R²)_z donde Leu se refiere al aminoácido leucina (por ejemplo, L-leucina) que está presente o ausente (es decir, cuando x es 1 or 0, respectivamente); Gln se refiere al aminoácido glutamina (por ejemplo, L-glutamina); Gly se refiere al residuo de aminoácido glicina (por ejemplo, L-glicina) que está presente o ausente (es decir, cuando y es 1 o 0, respectivamente).

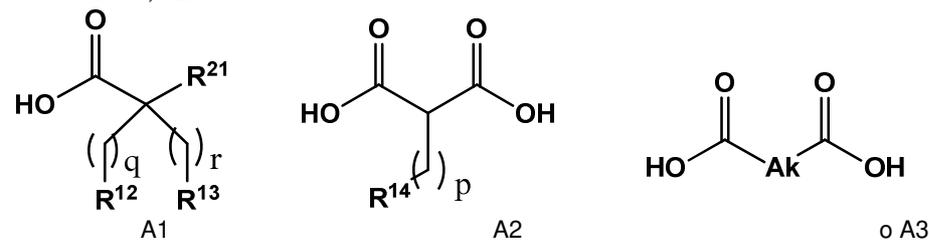
En algunas realizaciones, x es 0. En algunas realizaciones, x es 1. En algunas realizaciones, y es 0. En algunas realizaciones, y es 1. En algunas realizaciones, z es 0. En algunas realizaciones, z es 1.

En algunas realizaciones, W es alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. En algunas realizaciones, W es polietilenglicol que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 000 uma.

En algunas realizaciones, A está ausente. En algunas realizaciones, A es -O-. En algunas realizaciones, A es -NH-. En algunas realizaciones, A es -S-.

En algunas realizaciones, B está ausente. En algunas realizaciones, B es -O-. En algunas realizaciones, B es -C(O)-. En algunas realizaciones, B es -NH-. En algunas realizaciones, B es -C(O)NH-. En algunas realizaciones, B es -NHC(O)-. En algunas realizaciones, B es -OC(O)NH-. En algunas realizaciones, B es -OC(O)O-. En algunas realizaciones, B es -C=N(OH)-. En algunas realizaciones, B es -S(O₂)-. En algunas realizaciones, B es -NHS(O₂)-. En algunas realizaciones, B es -S(O₂)NH-. En algunas realizaciones, B es -S(O)-. En algunas realizaciones, B es -NHS(O)-. En algunas realizaciones, B es -S(O)NH-. En algunas realizaciones, B es -C(O)O-. En algunas realizaciones, B es -OC(O)-. En algunas realizaciones, B es -S-. En algunas realizaciones, B es =NH-O-. En algunas realizaciones, B es =NH-NH-. En algunas realizaciones, B es =NH-N(alquilo C₁-C₂₀)-.

En algunas realizaciones, R² es un ácido graso. En algunas realizaciones, el ácido graso puede ser de las siguientes Fórmulas A1, A2 o A3:



55

donde R¹¹ es CO₂H o H;
R¹², R¹³ y R¹⁴ son independientemente entre sí H, OH, CO₂H, -CH=CH₂ o -C≡CH;

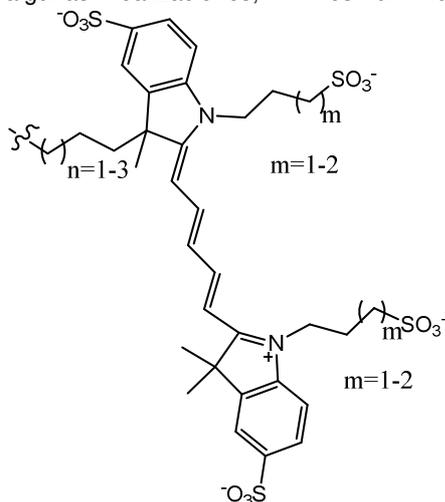
Ak es un alquileo C₆-C₃₀ ramificado;

p, q y r son independientemente entre sí un número entero entre 6 y 30;

o una amida, un éster o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

5

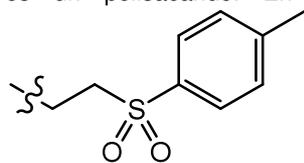
En algunas realizaciones, R² es (alquil C₁-C₃)-N₃ lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R² es ciclooctinilo. En algunas realizaciones, R² es un fluoróforo. En algunas realizaciones, el fluoróforo es de la fórmula



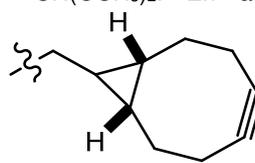
donde n es de 1 a 3 y cada m es de 1 a 2. En algunas realizaciones, n es 1.

10

En algunas realizaciones, n es 2. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, un m es 1 y el otro m es 2. En algunas realizaciones, ambos m son 1. En algunas realizaciones, ambos m son 2. En algunas realizaciones, R² es un polisacárido. En algunas realizaciones, R² es -CH(OCH₃)₂. En algunas realizaciones, R² es

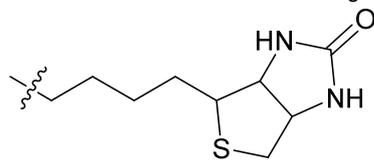


. En algunas realizaciones, R² es

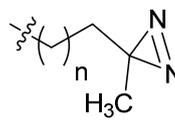


. En algunas realizaciones, R²

es

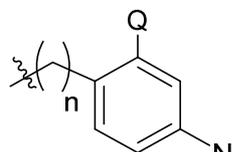
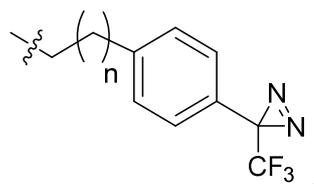


. En algunas realizaciones, R² es



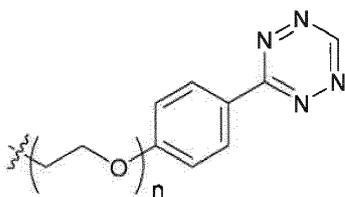
. En algunas realizaciones,

R² es



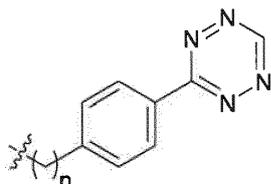
15

En algunas realizaciones, R² es Q. En algunas realizaciones, Q es H. En algunas realizaciones, Q es -NO₂. En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, n es de 1 a 6. En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, n es 2. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, n es 4. En algunas realizaciones, n es 5. En algunas realizaciones, n es 6.

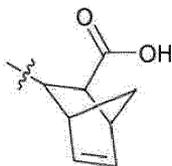


En algunas realizaciones, R² es . En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, n es de 1 a 6. En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, n es 2. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, n es 4. En algunas realizaciones, n es 5. En algunas realizaciones, n es 6.

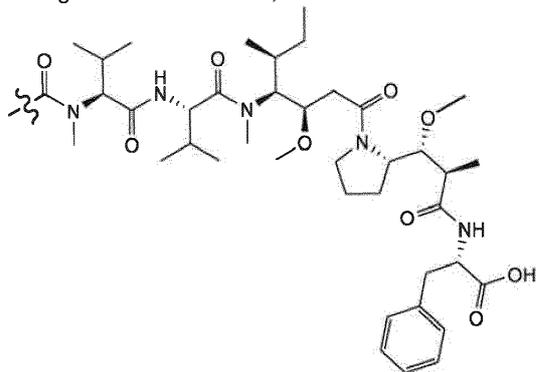
5



En algunas realizaciones, R² es . En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, n es de 1 a 6. En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, n es 2. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, n es 4. En algunas realizaciones, n es 5. En algunas realizaciones, n es 6.



10 En algunas realizaciones, R² es . En algunas realizaciones, R² es .



Además, un grupo multifuncional A-W-B-R² puede estar presente o ausente (es decir, cuando z es 1 o 0, respectivamente).

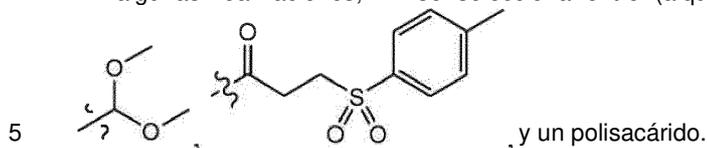
15 En algunas realizaciones que tienen A-W-B-R², W se selecciona entre alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado o polietilenglicol lineal o ramificado que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 000 uma. En algunas realizaciones, W se selecciona de alquilo C₁-C₆ lineal. En algunas realizaciones, W se selecciona de alquilo C₁-C₆ ramificado. En algunas realizaciones, W se selecciona de polietilenglicol lineal que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 10 000 uma. En algunas realizaciones, W se selecciona de polietilenglicol lineal que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 3000 uma. En algunas realizaciones, W se selecciona de polietilenglicol lineal que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 uma. En algunas realizaciones, W se selecciona de polietilenglicol lineal o ramificado que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 80 000 amu.

25 En algunas realizaciones, A está ausente. En algunas realizaciones, A es -O-. En algunas realizaciones, A es -NH-. En algunas realizaciones, A es -S-.

30 En algunas realizaciones, B está ausente. En algunas realizaciones, B es -O-. En algunas realizaciones, B es -C(O)-. En algunas realizaciones, B es -NH-. En algunas realizaciones, B es -C(O)NH-. En algunas realizaciones, B es -NHC(O)-. En algunas realizaciones, B es -NHC(O)O-. En algunas realizaciones, B es -OC(O)NH-. En algunas realizaciones, B es -OC(O)O-. En algunas realizaciones, B es -C=N(OH)-. En algunas realizaciones, B es -S(O₂)-. En algunas realizaciones, B es -NHS(O₂)-. En algunas realizaciones, B es -S(O₂)NH-. En algunas realizaciones, B es -S(O)-. En algunas realizaciones, B es -NHS(O)-. En algunas realizaciones, B es -S(O)NH-. En algunas realizaciones,

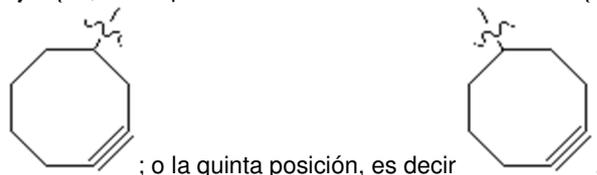
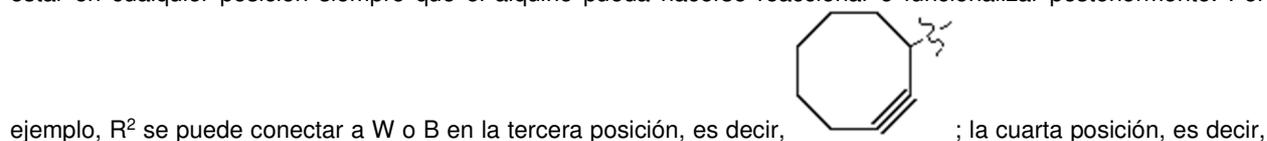
B es -C(O)O-. En algunas realizaciones, B es -OC(O)-. En algunas realizaciones, B es -S-. En algunas realizaciones, B es =NH-O-. En algunas realizaciones, B es =NH-NH-. En algunas realizaciones, B es =NH-N(alquilo C₁-C₂₀)-.

En algunas realizaciones, R² se selecciona entre (alquilo C₁-C₃)-N₃ lineal o ramificado, ciclooctinilo, fluoróforo

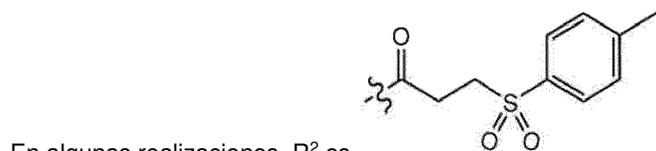
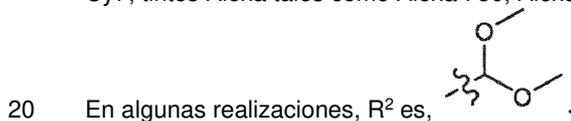


En algunas realizaciones, R² es (alquilo C₁-C₃)-N₃ ramificado o lineal. En algunas realizaciones, R² es (alquilo C₃)-N₃ ramificado. En algunas realizaciones, R² es (alquilo C₁-C₃)-N₃ lineal. En algunas realizaciones, R² es (alquilo C₁)-N₃. En algunas realizaciones, R² es (alquilo C₂)-N₃. En algunas realizaciones, R² es (alquilo C₃)-N₃ ramificado.

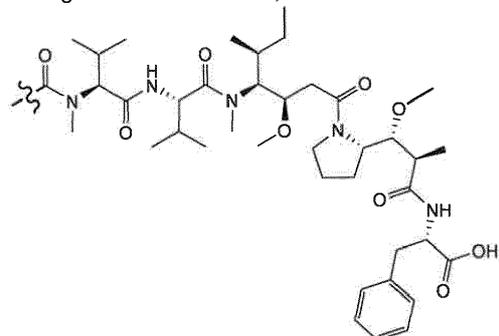
10 En algunas realizaciones, R² es ciclooctinilo. El punto de unión respecto al grupo con funcionalidad alquino puede estar en cualquier posición siempre que el alquino pueda hacerse reaccionar o funcionalizar posteriormente. Por



15 En algunas realizaciones, R² es fluoróforo. Los fluoróforos adecuados incluyen aquellos que pueden volver a emitir luz tras una excitación con luz. Habitualmente, el fluoróforo contiene varios enlaces pi conjugados tal como están presentes en los grupos aromáticos. Los ejemplos incluyen fluoresceína, rhodamina, tintes de Cy tales como Cy5 y Cy7, tintes Alexa tales como Alexa 750, Alexa 647 y Alexa 488, cumarinas y similares.



En algunas realizaciones, R² es



25 que corresponde a MMAF citotóxico conectado a través de un carbonilo a W en NH-W-R².

30 Cuando el grupo multifuncional A-W-B-R² está ausente, entonces el residuo de aminoácido adyacente, ya sea glutamina o glicina termina con el ácido carboxílico del residuo (el extremo C del esqueleto peptídico del compuesto modificador).

Polisacáridos

5 En algunas realizaciones, R² es un polisacárido. El polisacárido puede ser cualquier polisacárido antigénico, particularmente una forma de polisacárido procedente de un organismo patógeno. Los conjugados de estos polisacáridos pueden ser útiles para inmunizar a un sujeto frente a la infección provocada por el organismo patógeno. Algunos polisacáridos ilustrativos se describen más adelante. En particular, el polisacárido puede ser un polisacárido bacteriano, p. ej., un polisacárido capsular bacteriano. Los polisacáridos bacterianos representativos se describen en la Tabla 1.

Tabla 1.

Polisacárido	Unidad repetitiva
<i>Haemophilus influenzae</i> Tipo b ('PRP')	→3)-β-D-Ribf-(1→1)-D-Ribitol-(5→OPO ₃ →
<i>Neisseria meningitidis</i>	
Grupo A	→6)-α-D-ManpNAc(3OAc)-(1→OPO ₃ →
Grupo C	→9)-α-D-Neu5Ac(7/8OAc)-(2→
Grupo W135	→6)-α-D-Galp-(1→4)-α-D-Neu5Ac(9OAc)-2→
Grupo Y	→6)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Neu5Ac(9OAc)-2→
<i>Salmonella enterica Typhi Vi</i>	→α-D-GalpNAcA(3OAc)-(1→
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Tipo 1	→3)-D-AAT-α-Galp-(1→4)-α-D-GalpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-GalpA-(1→
Tipo 2	→4-β-D-Glcp-(1→3)-[α-D-GlcpA-(1→6)-α-D-Glcp-(1→2)]-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1-3)-β-L-Rhap-(1→
Tipo 3	→3)-β-D-GlcA-(1→4)-β-D-Glcp-(1→
Tipo 4	→3β-D-ManpNAc-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-D-GalpNAc-(1→4)-α-

10 Los polisacáridos se pueden utilizar en forma de oligosacáridos. Estos se forman convenientemente mediante la fragmentación del polisacárido purificado (p. ej., mediante hidrólisis), que habitualmente irá seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

15 Los polisacáridos se pueden purificar a partir de fuentes naturales. Como alternativa a la purificación, se pueden obtener polisacáridos mediante síntesis total o parcial.

Polisacáridos capsulares de *N. meningitidis*

20 El polisacárido puede ser un polisacárido capsular bacteriano. Los polisacáridos capsulares bacterianos incluyen los de *N. meningitidis*. Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado varios serogrupos de *N. meningitidis*, que incluyen A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y y Z. El polisacárido puede ser de cualquiera de estos serogrupos. Habitualmente, el polisacárido es de uno de los siguientes serogrupos de meningococos: A, C, W135 e Y.

25 Los polisacáridos capsulares se utilizarán generalmente en forma de oligosacáridos. Estos se forman convenientemente mediante la fragmentación del polisacárido capsular purificado (p. ej., mediante hidrólisis), que normalmente irá seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado. La fragmentación de polisacáridos se lleva a cabo habitualmente para obtener un grado promedio final de polimerización (DP) en el oligosacárido de menos de 30 (p. ej., entre 10 y 20, por ejemplo, alrededor de 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, por ejemplo, entre 15 y 20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). El DP se puede medir convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos (Ravenscroft *et al. Vaccine* 17, 2802-2816 (1999)).

35 Si se lleva a cabo una hidrólisis, el producto hidrolizado generalmente se clasificará por tamaños con el fin de eliminar los oligosacáridos de longitud corta (Costantino *et al. Vaccine* 17, 1251-1263 (1999)). Esto se puede conseguir de varias formas tales como ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior o igual a aproximadamente 6 se pueden eliminar para el serogrupo A, y aquellos inferiores a aproximadamente 4 se pueden eliminar para los serogrupos W135 e Y.

40 La hidrólisis química de sacáridos conlleva generalmente el tratamiento con ácido o base en condiciones que son estándar en la técnica. Las condiciones para la despolimerización de los polisacáridos capsulares en sus

monosacáridos constituyentes son conocidas en la técnica. Un método de despolimerización conlleva el uso de peróxido de hidrógeno (remítase al documento WO02/058737).

Se añade peróxido de hidrógeno a un sacárido (p. ej., para proporcionar una concentración de H₂O₂ final de un 1%) y la mezcla se incuba a continuación (p. ej., a aproximadamente 55 °C) hasta que se haya logrado una reducción de la longitud de la cadena deseada. La reducción a lo largo del tiempo puede ir seguida de la eliminación de muestras de la mezcla y posteriormente la medición del tamaño molecular (promedio) de sacárido en la muestra. La despolimerización se puede detener mediante enfriamiento rápido una vez que se haya logrado una longitud de cadena deseada.

Serogrupos C, W135 e Y

Las técnicas para preparar polisacáridos capsulares a partir de meningococos se conocen desde hace muchos años y habitualmente conllevan un proceso que comprende los pasos de precipitación de polisacáridos (p. ej., utilizando un detergente catiónico), fraccionamiento en etanol, extracción con fenol frío (para eliminar la proteína) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) (por ejemplo, remítase a Frash, *Advances in Biotechnological Processes* 13, 123-145 (1990) (eds. Mizrahi & Van Wezel).

Un proceso de este tipo conlleva precipitación de polisacáridos seguida de solubilización del polisacárido precipitado utilizando un alcohol inferior (remítase al documento WO03/007985).

La precipitación se puede conseguir utilizando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y cetiltrimetilamonio (p. ej., las sales de bromuro) o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. Se prefiere particularmente bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB') (Inzana, *Infect. Immun.* 55, 1573-1579 (1987). La solubilización del material precipitado se puede conseguir utilizando un alcohol inferior tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilpropan-2-ol, dioles, etc, pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar complejos de CTAB-polisacárido. Se puede añadir etanol al polisacárido precipitado para proporcionar una concentración de etanol final (basada en el contenido total de etanol y agua) de entre un 50% y un 95%.

Después de la resolubilización, el polisacárido se puede tratar adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que incluso una contaminación minoritaria no es aceptable (p. ej., para la producción de vacunas humanas). Esto conlleva habitualmente uno o más pasos de filtración, p. ej., se puede utilizar filtración en profundidad, filtración a través de carbón activado, filtración por tamaños y/o ultrafiltración. Una vez filtrados para eliminar los contaminantes, el polisacárido se puede precipitar para un tratamiento y/o procesamiento adicionales. Esto se puede conseguir convenientemente intercambiando cationes (p. ej., mediante la adición de sales de calcio o sodio).

Como alternativa a la purificación, se pueden obtener los polisacáridos capsulares de la presente invención mediante síntesis total o parcial, p. ej., la síntesis de Hib se divulga en Kandil *et al. Givcoconi J* 14, 13-17. (1997), y síntesis de MenA en Berkin *et al. Chemistry* 8, 4424- 4433 (2002).

El polisacárido se puede modificar químicamente, es decir, se puede O-acetilar o des-O-acetilar. Cualquier des-O-acetilación o hiperacetilación de este tipo puede estar en posiciones específicas en el polisacárido. Por ejemplo, la mayoría de cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en la posición C-7 y/o C-8 de los residuos de ácido siálico, pero aproximadamente un 15% de los aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo (Glode *et al., J Infect Dis* 139, 52-56 (1979); remítase también al documento WO94/05325 y la Patente de EE. UU. N.º 5 425 946). La acetilación no parece afectar a la eficacia protectora (p. ej., a diferencia del producto Menjugate™, el producto NeisVac-C™ utiliza un polisacárido des-O-acetilado, pero ambas vacunas son eficaces). El polisacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades de disacárido ácido siálico-galactosa. El polisacárido del serogrupo Y es similar al polisacárido del serogrupo W135, salvo por que la unidad repetitiva de disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa. Al igual que los polisacáridos del serogrupo C, los polisacáridos MenW135 y MenY tienen O-acetilación variable, pero en las posiciones de ácido siálico 7 y 9 (remítase al documento WO2005/033148). Cualesquiera modificaciones químicas de este tipo tienen lugar preferentemente antes de la conjugación, pero pueden tener lugar, alternativa o adicionalmente, durante la conjugación.

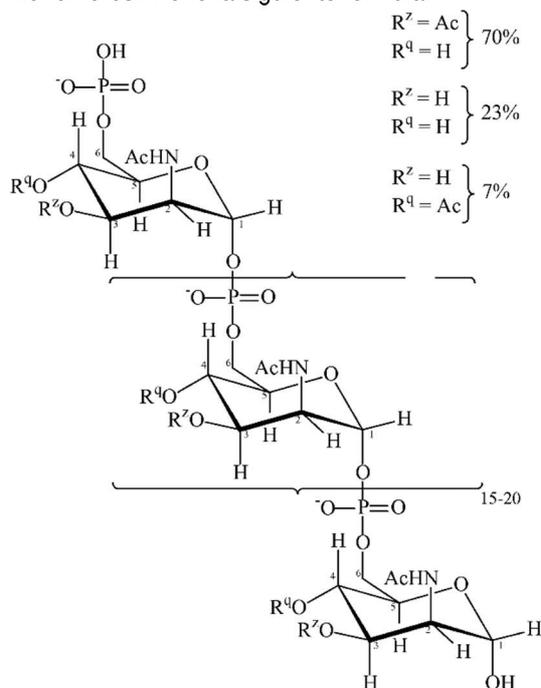
Los polisacáridos de serogrupos diferentes se pueden purificar por separado y, a continuación, se pueden combinar antes o después de la conjugación.

Serogrupo A

El polisacárido puede ser de un serogrupo A. El polisacárido se puede purificar de la misma forma que para los serogrupos C, W135 e Y (remítase a lo expuesto anteriormente), aunque es estructuralmente diferente; mientras que las cápsulas de los serogrupos C, W135 e Y se basan en torno al ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico, NeuAc), la cápsula del serogrupo A se basa en *N*-acetilmanosamina, que es el precursor natural del ácido siálico. El polisacárido

del serogrupo A es particularmente susceptible de hidrólisis, y su inestabilidad en medios acuosos implica que (a) la inmunogenicidad de las vacunas líquidas contra el serogrupo A disminuye a lo largo del tiempo y (b) el control de calidad es más difícil, debido a la liberación de productos de la hidrólisis de sacáridos en la vacuna.

- 5 El polisacárido capsular MenA nativo es un homopolímero de *N*-acetil-*D*-manosamina-1 -fosfato enlazado en (α1→6) con *O*-acetilación parcial en C3 y C4. El enlace glicosídico principal es un enlace fosfodiéster 1-6 que involucra el grupo hemiacetal de C1 y el grupo alcohol de C6 de la *D*-manosamina. La longitud de cadena promedio es de 93 monómeros. Tiene la siguiente fórmula:



- 10 Se ha preparado un polisacárido modificado que retiene la actividad inmunogénica del polisacárido del serogrupo A nativo, pero que es mucho más estable en agua. Los grupos hidroxilo unidos en los carbonos 3 y 4 de las unidades de monosacárido se reemplazan con un grupo de bloqueo (remítase a los documentos WO03/080678 y WO2008/084411).

- 15 El número de unidades de monosacárido que tienen grupos de bloqueo en lugar de hidroxilos puede variar. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las unidades de monosacárido pueden tener grupos de bloqueo. Como alternativa, al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las unidades de monosacárido pueden tener grupos de bloqueo. Al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 unidades de monosacárido pueden tener grupos de bloqueo.

- 20 Del mismo modo, el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacárido puede variar. Por ejemplo, el número de grupos de bloqueo en cualquier unidad de monosacárido particular puede ser 1 o 2.

- 25 La unidad de monosacárido terminal puede tener o no un grupo de bloqueo en lugar de su hidroxilo nativo. Se prefiere mantener un grupo hidroxilo anomérico libre en una unidad de monosacárido terminal con el fin de proporcionar un anclaje para reacciones adicionales (p. ej., conjugación). Se pueden convertir los grupos hidroxilo anoméricos en grupos amino

- 30 (-NH₂ o -NH-E, donde E es un grupo protector de nitrógeno) mediante aminación reductora (utilizando, por ejemplo, NaBH₃CN/NH₄Cl) y, a continuación, se pueden regenerar después de que otros grupos hidroxilo se hayan convertido en grupos de bloqueo.

- Los grupos de bloqueo para reemplazar grupos hidroxilo pueden ser accesibles directamente mediante una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir, reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo con otro grupo. Algunos derivados adecuados de grupos hidroxilo que actúan como grupos de bloqueo son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (p. ej., éteres de sililo o éteres de alquilo) y acetales. Algunos ejemplos específicos de dichos grupos de bloqueo son alilo, Aloe, bencilo, BOM, *t*-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Otros grupos de bloqueo que no son accesibles directamente y que reemplazan completamente el grupo hidroxilo incluyen alquilo C₁₋₁₂, alquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, NR²¹R²² (R²¹ y R²² se definen en el siguiente párrafo), H, F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃, CCl₃, etc.

- 40

Algunos grupos de bloqueo habituales son de la fórmula: $-O-X'-Y'$ y $-OR^{23}$ donde: X' es C(O), S(O) o SO₂; Y es alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ o aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales se puede sustituir opcionalmente con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o Y' es NR²¹R²²; R²¹ y R²² se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆; o R²¹ y R²² se pueden unir para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂; R²³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, cada uno de los cuales se puede sustituir opcionalmente con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o R²³ es arilo C₅₋₁₂ o aril C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales se puede sustituir opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados entre F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃. Cuando R²³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, está habitualmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos tal como se ha definido anteriormente. Cuando R²¹ y R²² se unen para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂, se pretende que R²¹ y R²², junto con el átomo de nitrógeno formen un grupo heterocíclico saturado que contenga cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (p. ej., C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). El grupo heterocíclico puede contener 1 o 2 heteroátomos (tales como N, O o S) aparte del átomo de nitrógeno. Algunos ejemplos de grupos heterocíclicos saturados C₃₋₁₂ son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidínilo y aziridinilo.

Los grupos de bloqueo $-O-X-Y$ y $-OR^{23}$ se pueden preparar a partir de grupos $-OH$ mediante procedimientos de derivatización estándar tales como reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, haluro de alquilo, haluro de sulfonilo, etc. Por tanto, el átomo de oxígeno en $-O-X'-Y'$ es normalmente el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo $-X'-Y'$ en $-O-X'-Y'$ habitualmente reemplaza el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

Como alternativa, los grupos de bloqueo pueden ser accesibles mediante una reacción de sustitución tal como una sustitución de tipo Mitsunobu. Estos y otros métodos para preparar grupos de bloqueo a partir de grupos hidroxilo son muy conocidos.

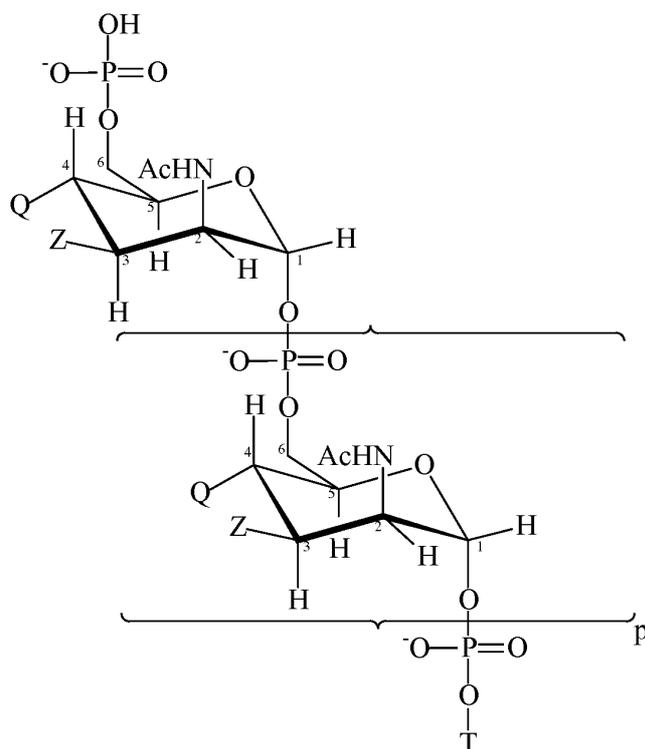
Los grupos de bloqueo específicos para su uso en la invención son $-OC(O)CF_3$ (Nilsson & Svensson *Carbohydrate Research* 69, 292-296 (1979)) y un grupo carbamato $OC(O)NR^{21}R^{22}$, donde R²¹ y R²² se seleccionan independientemente de alquilo C₁₋₆. Habitualmente, R²¹ y R²² son ambos metilo, es decir, el grupo de bloqueo es $-OC(O)NMe_2$. Los grupos de bloqueo de tipo carbamato tienen un efecto estabilizante sobre el enlace glicosídico y se pueden preparar en condiciones suaves.

Un grupo de bloqueo particularmente preferido es $-OC(O)CH_3$ (remítase al documento WO2008/084411). La proporción de posiciones 4 y/o 3 en el polisacárido del serogrupo A de *Neisseria meningitidis* modificado que tiene este grupo de bloqueo puede variar. Por ejemplo, la proporción de posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo puede ser de aproximadamente un 0%, al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o aproximadamente un 100%, prefiriéndose al menos un 80% y aproximadamente un 100%. De forma similar, la proporción de posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo puede ser de aproximadamente un 0%, al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o aproximadamente un 100%, prefiriéndose al menos un 80% y aproximadamente un 100%. Habitualmente, la proporción de posiciones 4 y 3 que tienen grupos de bloqueo es aproximadamente la misma en cada posición. Dicho de otro modo, la proporción de posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo respecto a las posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo es de aproximadamente 1:1. Sin embargo, en algunas realizaciones, la proporción de posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo puede variar respecto a la proporción de posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo. Por ejemplo, la proporción de posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo respecto a las posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo puede ser 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 o 1:2. De forma similar, la proporción de posiciones 3 que tienen grupos de bloqueo respecto a las posiciones 4 que tienen grupos de bloqueo puede ser 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 o 1:2.

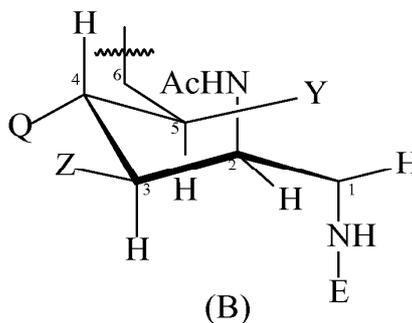
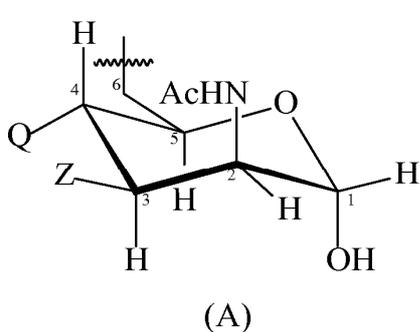
Los polisacáridos de MenA modificados habituales contienen n unidades de monosacárido, donde al menos un h% de las unidades de monosacárido no tienen grupos $-OH$ en ambas de las posiciones 3 y 4. El valor de h es 24 o más (p. ej., 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100) y es normalmente 50 o más. Los grupos $-OH$ ausentes son grupos de bloqueo tal como se han definido anteriormente.

Otros polisacáridos MenA modificados habituales comprenden unidades de monosacárido, donde al menos s de las unidades de monosacárido no tienen $-OH$ en la posición 3 y no tienen $-OH$ en la posición 4. El valor de s es al menos 1 (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90). Los grupos $-OH$ ausentes son grupos de bloqueo tal como se han definido anteriormente.

Los polisacáridos MenA modificados adecuados tienen la fórmula:



donde p es un número entero de 1 a 100 (particularmente un número entero de 5 a 25, normalmente 15-25); T es de la fórmula (A) o (B):



- 5 cada grupo Z se selecciona independientemente entre OH o un grupo de bloqueo tal como se ha definido anteriormente; y
 cada grupo Q se selecciona independientemente entre OH o un grupo de bloqueo tal como se ha definido anteriormente;
 Y se selecciona entre OH o un grupo de bloqueo tal como se ha definido anteriormente;
- 10 E es H o un grupo protector de nitrógeno; y donde más de aproximadamente un 7% (p. ej., un 8%, 9%, 10% o más) de los grupos Q son grupos de bloqueo. En algunas realizaciones, el grupo hidroxilo unido en el carbono 1 en la fórmula (A) se reemplaza por un grupo de bloqueo tal como se ha definido anteriormente. En algunas realizaciones, E en la fórmula (B) es un conector o una molécula portadora tal como se discute más adelante. Cuando E es un conector, el conector puede estar unido covalentemente a una molécula portadora.
- 15 Cada uno de los p+2 grupos Z puede ser igual o diferente entre sí. Del mismo modo, cada uno de los n+2 grupos Q puede ser igual o diferente entre sí. Todos los grupos Z pueden ser OH. Como alternativa, al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% de los grupos Z pueden ser OAc. Habitualmente, aproximadamente un 70% de los grupos Z son OAc, siendo el resto de los grupos Z OH o grupos de bloqueo tal como se han definido anteriormente. Al menos aproximadamente un 7% de los grupos Q son grupos de bloqueo. Habitualmente, al menos un 10%, 20%, 30%, 40%,
 20 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso un 100% de los grupos Q son grupos de bloqueo.

Glucanos

- 25 El polisacárido puede ser un glucano. Los glucanos son polisacáridos que contienen glucosa que se encuentran, entre otros, en las paredes celulares de hongos. Los α-glucanos incluyen uno o más enlaces α entre subunidades de

glucosa, mientras que los β -glucanos incluyen uno o más enlaces β entre subunidades de glucosa. El glucano utilizado de acuerdo con la invención incluye enlaces β , y puede contener solamente enlaces β (es decir, no enlaces α).

El glucano puede comprender uno o más enlaces β -1,3 y/o uno o más enlaces β -1,6. También puede comprender uno o más enlaces β -1,2 y/o enlaces β -1,4, pero normalmente sus únicos enlaces β serán enlaces β -1,3 y/o enlaces β -1,6. El glucano puede ser lineal o ramificado. Los β -glucanos nativos de longitud completa son insolubles y tienen un peso molecular promedio ponderado en el rango de los megadalton. Por tanto, es mejor utilizar glucanos solubles en los conjugados. La solubilización se puede conseguir fragmentando glucanos largos insolubles. Esto se puede conseguir mediante hidrólisis o, más convenientemente, mediante digestión con una glucanasa (p. ej., con una β -1,3-glucanasa o una β -1,6-glucanasa). Como alternativa, los glucanos cortos se pueden preparar sintéticamente uniendo componentes monosacáridos.

Se prefieren los glucanos de bajo peso molecular, particularmente aquellos con un peso molecular promedio ponderado inferior a 100 kDa (p. ej., menos de 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 o 15 kDa). También es posible utilizar oligosacáridos, por ejemplo, que contengan 60 o menos (p. ej., 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4) unidades de monosacárido de glucosa. Dentro de este intervalo, oligosacáridos con entre 10 y 50 o entre 20 y 40 unidades de monosacárido. El glucano puede ser un glucano fúngico. Un glucano fúngico se obtendrá generalmente a partir de un hongo, pero cuando una estructura de glucano particular se encuentre tanto en hongos como en no hongos (p. ej., en bacterias, plantas inferiores o algas) entonces se puede utilizar el organismo no fúngico como una fuente alternativa. Por tanto, el glucano se puede obtener a partir de la pared celular de una *Candida* tal como *C. albicans*, o a partir de *Coccidioides immitis*, *Trichophyton verrucosum*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, o *Pythium insidiosum*.

Existen varias fuentes de β -glucanos fúngicos. Por ejemplo, hay β -glucanos puros comercializados, p. ej., el pustulano (Calbiochem) es un glucano β -1,6 purificado a partir de *Umbilicaria papulosa*. Los β -glucanos se pueden purificar a partir de paredes celulares fúngicas de varias formas. Tokunaka *et al.* *Carbohydrate Research* 316, 161-172. (1999), por ejemplo, divulga un procedimiento de dos pasos para preparar un extracto de β -glucanos hidrosolubles a partir de *Candida*, exento de manano de la pared celular, que conlleva la oxidación con NaClO y la extracción con DMSO. El producto resultante (' β -D-glucano soluble de *Candida*' o 'CSBG') está compuesto principalmente por un glucano β -1,3 lineal con un resto de glucano β -1,6 lineal. De forma similar, el documento WO03/097091 divulga la producción de GG-zym a partir de *Calbicans*. Dichos glucanos de *C. albicans* incluyen (a) glucanos β -1,6 con cadenas laterales de glucano β -1,3 y un grado promedio de polimerización de aproximadamente 30, y (b) glucanos β -1,3 con cadenas laterales de glucano β -1,6 y un grado promedio de polimerización de aproximadamente 4.

En algunas realizaciones, el glucano es un glucano β -1,3 con alguna ramificación β -1,6, tal como se observa, por ejemplo, en las laminarinas. Las laminarinas se encuentran en algas y macroalgas marrones. Las proporciones β (1-3): β (1-6) de las laminarinas varían entre fuentes diferentes, p. ej., es tan baja como 3:2 en *Eisenia bicyclis laminarin*, pero tan alta como 7:1 en *Laminaria digitata laminarin* (Pang *et al.* *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 553-8 (2005)). Por tanto, el glucano puede tener una proporción β (1-3): β (1-6) de entre 1,5:1 y 7,5:1, p. ej., aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 o 7:1. Opcionalmente, el glucano puede tener una subunidad de manitol terminal, p. ej., un residuo de manitol con unión 1,1-O (Read *et al.* *Carbohydr Res.* 281, 187-201 (1996)). El glucano puede comprender también subunidades de manosa.

En otras realizaciones, el glucano tiene exclusiva o principalmente enlaces β -1,3, tal como se observa en el curdlano. Estos glucanos pueden suscitar una protección mejor que los glucanos que comprenden otros enlaces, particularmente glucanos que comprenden enlaces β -1,3 y una proporción mayor de enlaces β -1,6. Por tanto, el glucano puede estar compuesto solamente por residuos de glucosa con unión β -1,3 (p. ej., β -D-glucopiranosas con enlaces exclusivamente 1,3). Opcionalmente, sin embargo, el glucano puede incluir residuos de monosacáridos que no son residuos de glucosa con unión β -1,3, p. ej., puede incluir residuos de glucosa con unión β -1,6. La proporción de residuos de glucosa con unión β -1,3 respecto a estos otros residuos debería ser de al menos 8:1 (p. ej., >9:1, >10:1, >11:1, >12:1, >13:1, >14:1, >15:1, >16:1, >17:1, >18:1, >19:1, >20:1, >25:1, >30:1, >35:1, >40:1, >45:1, >50:1, >75:1, >100:1, etc.) y/o hay una o más (p. ej., >1, >2, >3, >4, >5, >6, >7, >8, >9, >10, >11, >12, etc.) secuencias de al menos cinco (p. ej., >5, >6, >7, >8, >9, >10, >11, >12, >13, >14, >15, >16, >17, >18, >19, >20, >30, >40, >50, >60, etc.) residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos solamente por enlaces β -1,3. Se pretende que la expresión «no terminal» se refiera a que el residuo no está presente en un extremo libre del glucano. En algunas realizaciones, puede que los residuos no terminales adyacentes no incluyan ningún residuo acoplado a una molécula portadora o conector. La presencia de cinco residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos solamente mediante enlaces β -1,3 puede proporcionar una respuesta de anticuerpos protectores, p. ej., contra *C. albicans*.

En realizaciones adicionales, un conjugado puede incluir dos glucanos diferentes, p. ej., un primer glucano que tenga una proporción β (1-3): β (1-6) de entre 1,5:1 y 7,5:1, y un segundo glucano que tenga exclusiva o principalmente enlaces β -1,3. Por ejemplo, un conjugado puede incluir tanto un glucano de laminarina como un glucano de curdlano. Cuando un β -glucano incluye tanto enlaces β -1,3 como β -1,6 en una proporción y/o secuencia deseadas, entonces este

glucano se puede encontrar en la naturaleza (p. ej., una laminarina) o se puede producir de forma artificial. Por ejemplo, se puede producir mediante síntesis química, en todo o en parte.

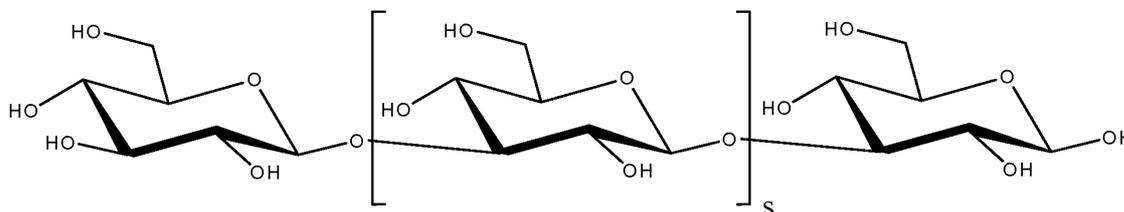
Los métodos para la síntesis química de glucanos β -1,3/ β -1,6 son conocidos, por ejemplo, a partir de Takeo y Tei *Carbohydr Res.* 145, 293-306 (1986), Tanaka *et al. Tetrahedron Letters* 44, 3053-3057 (2003), Ning *et al. Tetrahedron Letters* 43, 5545-5549 (2002), Geurtsen *et al. Journal of Organic Chemistry* 64 (21):7828-7835 (1999), Wu *et al. Carbohydr Res.* 338, 2203-12 (2003), Nicolaou *et al. J. Am. Chem. Soc.* 119, 449-450 (1997), Yamada *et al. Tetrahedron Letters* 40, 4581-4584 (1999), Yamago *et al. Org. Lett.* 24, 3867-3870 (2001), Yuguo *et al. Tetrahedron* 60, 6345-6351 (2004), Amaya *et al. Tetrahedron Letters* 42:9191-9194 (2001), Mei *et al. Carbohydr Res.* 340, 2345-2351 (2005).

Un β -glucano que incluye tanto enlaces β -1,3 como β -1,6 en una proporción deseada también se puede producir partiendo de un glucano disponible y tratándolo con una β -1,6-glucanasa (también conocida como endo-1,6- β -glucosidasa de glucanos, 1,6- β -D-glucano- glucanohidrolasa, etc.; EC 3.2.1.75) o una β -1,3-glucanasa (tal como una exo-1,3-glucanasa (EC 3.2.1.58) o una endo-1,3-glucanasa (EC 3.2.1.39) hasta que se alcance una proporción y/o secuencia deseada.

Cuando se desea un glucano que contiene solamente glucosa con unión β -1,3, entonces se puede aplicar un tratamiento con β -1,6-glucanasa hasta la finalización, ya que la β -1,6-glucanasa proporcionará en última instancia β -1,3 glucano puro. Sin embargo, más convenientemente, se puede utilizar un β -1,3-glucano puro. Estos se pueden producir sintéticamente, mediante síntesis químicas y/o enzimáticas, p. ej., utilizando una (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano-sintasa, de las cuales se conocen varias de muchos organismos (que incluyen bacterias, levaduras, plantas y hongos). Los métodos para la síntesis química de β -1,3 glucanos son conocidas, por ejemplo, de Takeo *et al. Carbohydr Res.* 245, 81-96 (1993), Jamois *et al. Glycobiology* 15(4), 393-407 (2005), Lefeber *et al. C em. Eur. J.* 7(20):441 1-4421 (2001) y Huang *et al. Carbohydr Res.* 340, 603-608 (2005). Como alternativa útil a la síntesis, se puede utilizar un β -1,3-glucano natural tal como un curdlano (β -1,3-glucano lineal de una *Agrobacterium* conocida previamente como *Alcaligenes faecalis var. myxogenes*; comercializada, por ejemplo, por Sigma-Aldrich catálogo C7821) o paramilo (β -1,3-glucano de *Euglena*). Los organismos que producen niveles elevados de β -1,3-glucanos son conocidos en la técnica, p. ej., la *Agrobacterium* de la Patente de EE. UU. N.º 5508191 o MiKyoung *et al. Biochemical Engineering Journal.* 16, 163-8 (2003), o la *Euglena gracilis* de Barsanti *et al. J App. Phycology*, 13, 59-65 (2001).

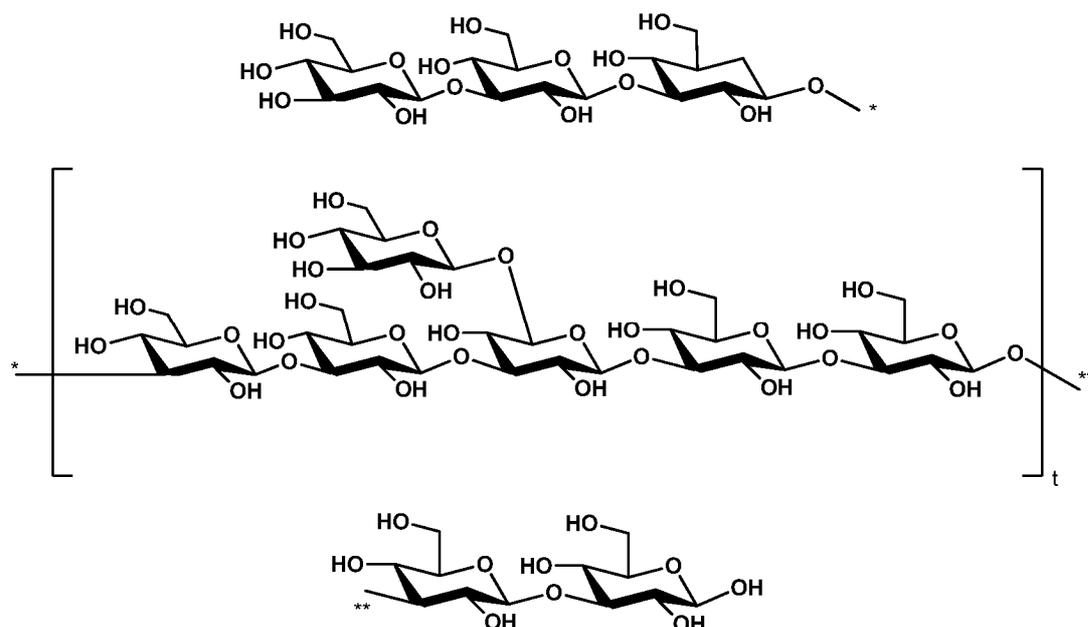
La laminarina y el curdlano se encuentran habitualmente en la naturaleza como polímeros de alto peso molecular, p. ej., con un peso molecular promedio ponderado de al menos 100 kDa. A menudo son insolubles en medios acuosos. En sus formas naturales, por tanto, no son adecuados para la inmunización. Por tanto, en algunas realizaciones, un glucano más corto, por ejemplo, aquellos que contienen 60 o menos unidades de monosacárido de glucosa (por ejemplo, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4). Se puede utilizar un glucano que tenga un número de residuos de glucosa en el intervalo de 2-60, p. ej., entre aproximadamente 10-50 o entre aproximadamente 20-40 unidades de glucosa. Un glucano con 25-30 residuos de glucosa es particularmente útil. Se pueden formar glucanos adecuados, por ejemplo, mediante hidrólisis ácida de un glucano natural, o mediante digestión enzimática, por ejemplo, con una glucanasa tal como una β -1,3-glucanasa. Un glucano con 11-19, p. ej., 13-19 y particularmente 15 o 17, unidades de monosacárido de glucosa también es útil. En particular, se contemplan específicamente para el uso glucanos con las siguientes estructuras (A) o (B):

(A)



donde $s+2$ se encuentra en el intervalo de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 2-40.

En algunas realizaciones, $s+2$ se encuentra en el intervalo de 25-30 o de 11-19, por ejemplo, 13-17. En particular, $s+2 = 15$ es adecuado. Además, $s+2 = 6$ es adecuado.



donde t se encuentra en el intervalo de 0-9, por ejemplo, entre 1-7 o entre 2-6. Preferentemente, t se encuentra en el intervalo de 3-4 o 1-3. En particular, $t = 2$ es adecuado. El término « y » indica los respectivos puntos de unión de las unidades de polisacárido.

5 En algunas realizaciones, el glucano contiene entre 5 y 7 unidades de monosacárido de glucosa (es decir, 5, 6 o 7). En particular, se puede preferir un glucano que tenga 6 unidades de monosacárido de glucosa. Por ejemplo, el glucano puede ser un curdlano que tenga 6 unidades de monosacárido de glucosa.

10 En algunas realizaciones, el glucano es una especie molecular única. En estas realizaciones, todas las moléculas de glucano son idénticas en términos de secuencia.

15 Por consiguiente, todas las moléculas de glucano son idénticas en cuanto a sus propiedades estructurales, que incluyen peso molecular, etc. Habitualmente, esta forma de glucano se obtiene mediante síntesis química, por ejemplo, utilizando los métodos descritos anteriormente. Como alternativa, en otras realizaciones, el glucano se puede obtener a partir de un glucano natural, por ejemplo, un glucano de *L. digitata*, *Agrobacterium* o *Euglena* tal como se ha descrito anteriormente, purificándose el glucano hasta que se obtenga la especie molecular única requerida. Los glucanos naturales que se han purificado de esta forma están comercializados. Un glucano que es una especie molecular única se puede identificar midiendo la polidispersidad (P_m/P_n) de la muestra de glucanos. Este parámetro se puede medir convenientemente por SEC-MALLS, por ejemplo, tal como se ha descrito en Bardotti *et al.* *Vaccine* 26, 2284-96 (2008).
 20 Los glucanos adecuados para su uso en esta realización de la invención tienen una polidispersidad de aproximadamente 1, por ejemplo, 1,01 o menos.

25 La solubilidad de los glucanos naturales tales como el curdlano, se puede aumentar introduciendo grupos iónicos (por ejemplo, mediante sulfatación, particularmente a 0-6 en el curdlano). Dichas modificaciones se pueden utilizar con la invención, pero idealmente se evitan, ya que pueden alterar la antigenicidad del glucano.

Cuando el polisacárido es un glucano, es habitualmente una laminarina.

30 Polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*

Tal como se ha discutido anteriormente, el polisacárido también puede ser un polisacárido capsular bacteriano. Algunos polisacáridos capsulares bacterianos ilustrativos adicionales incluyen los de *S. pneumoniae*. Cuando el polisacárido es un polisacárido capsular de *S. pneumoniae*, es habitualmente de uno de los siguientes serotipos de pneumococos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.
 35 En algunas realizaciones, es de 1, 5, 6B, 14, 19F y 23F. Los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* comprenden unidades repetitivas de oligosacáridos que pueden contener hasta 8 residuos de azúcar. Las unidades de oligosacáridos para los serotipos de *S. pneumoniae* principales se describen en la tabla anterior, Jones *An. Acad. Bras. Cienc.*, 77(2), 293-324 (2005) y Jones, *J Pharm Biomed Anal* 38, 840-850 (2005).
 40

Polisacáridos capsulares de *S.agalactiae*

Algunos polisacáridos capsulares bacterianos ilustrativos adicionales incluyen los de *Streptococcus agalactiae* ("GBS"). El polisacárido capsular está unido covalentemente al esqueleto de peptidoglicanos de GBS y es diferente del antígeno del grupo B, que es otro polisacárido que está unido al esqueleto de peptidoglicano.

Los polisacáridos capsulares de GBS están relacionados desde un punto de vista químico, pero son muy diferentes desde un punto de vista antigénico. Todos los polisacáridos capsulares de GBS comparten el siguiente núcleo de trisacáridos: β -D-GlcpNAc(1 \rightarrow 3) β -D-Galp(1 \rightarrow 4) β -D-Glcp

Los varios serotipos de GBS difieren en la forma en la que se modifica este núcleo. La diferencia entre los serotipos 1a y III, por ejemplo, surge del uso de la GlcNAc (1a) o la Gal (III) en este núcleo para unir núcleos de trisacáridos consecutivos.

Los serotipos 1a y 1b tienen ambos un disacárido [α -D-NeupNAc(2 \rightarrow 3) β -D-Galp-(1 \rightarrow) unido a la GlcNAc en el núcleo, pero el enlace es 1 \rightarrow 4 (1a) o 1 \rightarrow 3 (1b).

La enfermedad relacionada con GBS surge principalmente de los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, estando causado más de un 85% por cinco serotipos: Ia, Ib, III y V. Se puede utilizar un polisacárido de uno de estos cuatro serotipos. Los polisacáridos capsulares de cada uno de estos cuatro serotipos incluyen: (a) un residuo de ácido *N*-acetilneuramínico (NeuNAc) terminal (comúnmente denominado ácido siálico), que en todos los casos está unido en 2 \rightarrow 3 a un residuo de galactosa; y (b) un residuo de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) dentro del núcleo de trisacáridos.

Los cuatro polisacáridos incluyen residuos de galactosa dentro del núcleo de trisacáridos, pero los serotipos Ia, Ib, II y III también contienen residuos de galactosa adicionales en cada unidad repetitiva.

Los polisacáridos utilizados se pueden encontrar en su forma nativa, o se pueden haber modificado. Por ejemplo, el polisacárido puede ser más corto que el polisacárido capsular nativo, o se puede modificar químicamente. En particular, el polisacárido capsular del serotipo V utilizado en la invención se puede modificar tal como se describe en el documento WO2006/050341 y Guttormsen *et al. Proc Natl Acad Sci USA*. 105(15), 5903-8 (2008) Epub, 31 de marzo de 2008. Por ejemplo, un polisacárido capsular del serotipo V que ha sido sustancialmente desialilado. El polisacárido capsular del serotipo V de GBS desialilado se puede preparar tratando el polisacárido capsular del serotipo V de GBS purificado en condiciones ligeramente ácidas (por ejemplo, ácido sulfúrico 0,1 M a 80 °C durante 60 minutos) o mediante tratamiento con neuraminidasa. Por tanto, el polisacárido utilizado de acuerdo con la invención puede ser un polisacárido capsular de longitud sustancialmente completa, tal como se encuentra en la naturaleza, o puede ser más corto que la longitud natural. Los polisacáridos de longitud completa se pueden despolimerizar para proporcionar fragmentos más cortos para su uso con la invención, por ejemplo, mediante hidrólisis en ácido débil, mediante calentamiento, mediante cromatografía de dimensionamiento, etc. En particular, los polisacáridos capsulares del serotipo II y/o III utilizados en la invención se pueden despolimerizar tal como se describe en el documento WO96/40795 y Michon *et al. Clin Vaccine Immunol*. (2006) 13(8), 936-43.

El polisacárido se puede modificar químicamente respecto al polisacárido capsular tal como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el polisacárido se puede des-*O*-acetilar (parcial o totalmente), des-*N*-acetilar (parcial o totalmente), *N*-propionar (parcial o totalmente), etc. La desacetilación puede tener lugar antes, durante o después de la conjugación, pero preferentemente tiene lugar antes de la conjugación. Dependiendo del polisacárido particular, la desacetilación puede afectar o no a la inmunogenicidad. La relevancia de la *O*-acetilación en los polisacáridos de GBS en varios serotipos se discute en Lewis *et al. PNAS USA* 101, 11123-8 (2004), y en algunas realizaciones, la *O*-acetilación de residuos de ácido siálico en las posiciones 7, 8 y/o 9 se mantiene antes, durante y después de la conjugación, por ejemplo, mediante protección/desprotección, mediante reacetilación, etc. Sin embargo, habitualmente el polisacárido de GBS utilizado en la presente invención tiene una *O*-acetilación sustancialmente nula de los residuos de ácido siálico en las posiciones 7, 8 y/o 9. En particular, cuando el polisacárido de GBS se ha purificado mediante extracción con base tal como se describe más adelante, entonces habitualmente se pierde la *O*-acetilación. El efecto de la desacetilación, etc. se puede evaluar mediante ensayos rutinarios.

Los polisacáridos capsulares se pueden purificar mediante técnicas conocidas tal como se describe en Wessels *et al. Infect Immun* 57, 1089-94 (1989) Un proceso típico conlleva extracción con base, centrifugación, filtración, tratamiento con ARNasa/ADNasa, tratamiento con proteasa, concentración, cromatografía de exclusión por tamaños, ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y ultrafiltración adicional. El tratamiento de las células de GBS con la enzima mutanolisina, que escinde la pared celular bacteriana para liberar los componentes de la pared celular, también es útil.

Como alternativa, se puede utilizar el proceso de purificación descrito en el documento WO2006/082527. Esto conlleva extracción con base, tratamiento con etanol/CaCl₂, precipitación con CTAB y resolubilización. Se describe un proceso alternativo adicional en el documento WO2009/081276.

Polisacáridos capsulares de *S. aureus*

Algunos polisacáridos capsulares bacterianos ilustrativos adicionales incluyen los de *S. aureus*, particularmente los polisacáridos capsulares de *S. aureus* tipo 5 y tipo 8. Las estructuras de los polisacáridos capsulares de tipo 5 y tipo 8 se describieron en Moreau *et al. Carbohydrate Res.* 339(5), 285-91 (1990) y Fournier *et al. Infect. Immun.* 45(1), 87-93 (1984) como:

Tipo 5

→ 4)-β-D-ManNAcA(30Ac)-(1→ 4)-a-L-FucNAc(1→ 3)-β-D-FucNAc-(1

Tipo 8

→ 3)-β-D-ManNAcA(40Ac)-(1→ 3)-a-L-FucNAc(1→ 3)-β-D-FucNAc-(1

Los datos espectroscópicos de RMN recientes (Jones *Carbohydrate Res.* 340(6), 1097-106 (2005)) ha dado lugar a una revisión de estas estructuras a:

Tipo 5

→ 4)-β-D-ManNAcA-(1→ 4)-a-L-FucNAc(30Ac)-(1→ 3)-β-D-FucNAc-(1

Tipo 8

→ 3)-β-D-ManNAcA(40Ac)-(1→ 3)-a-L-FucNAc(1→ 3)-a-D-FucNAc(1→

El polisacárido se puede modificar químicamente respecto al polisacárido capsular tal como se encuentra en la naturaleza.

Por ejemplo, el polisacárido se puede des-*O*-acetilar (parcial o totalmente), des-*N*-acetilar (parcial o totalmente), *N*-propionar (parcial o totalmente), etc. La desacetilación puede tener lugar antes, durante o después de la conjugación, pero habitualmente tiene lugar antes de la conjugación. El efecto de la desacetilación, etc. se puede evaluar mediante ensayos rutinarios. Por ejemplo, la relevancia de la *O*-acetilación en los polisacáridos capsulares de tipo 5 o de tipo 8 de *S. aureus* se discute en Fattom *et al. Infect Immun.* 66(10):4588-92 (1998). Se dice que los polisacáridos nativos en este documento tienen un 75% de *O*-acetilación. Estos polisacáridos indujeron anticuerpos tanto para el esqueleto de polisacáridos como para los grupos *O*-acetilo. Los polisacáridos con un 0% de *O*-acetilación aún generaron anticuerpos para el esqueleto de polisacáridos. Ambos tipos de anticuerpo fueron opsónicos frente a cepas de *S. aureus* que variaron en su contenido de *O*-acetilo. Por consiguiente, los polisacáridos capsulares de tipo 5 o de tipo 8 utilizados en la presente invención pueden tener entre un 0 y un 100% de *O*-acetilación.

El grado de *O*-acetilación del polisacárido se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante RMN de protón (p. ej., tal como se describe en Lemercinier y Jones *Carbohydrate Res.* 296, 83-96 (1996), Jones y Lemercinier, *J Pharm Biomed Anal.* 30(4), 1233-47 (2002), el documento WO05/033148 o el documento WO 00/56357. Un método adicional se describe en Hestrin *J. Biol. Chem.* 180, 249-261 (1949). Se pueden utilizar métodos similares para determinar el grado de *N*-acetilación del polisacárido. Los grupos *O*-acetilo se pueden eliminar mediante hidrólisis, por ejemplo, mediante tratamiento con una base tal como hidrazina anhidra (Konadu *et al. Infect. Immun.* 62, 5048-5054 (1994)) o NaOH (Fattom *et al. Infect Immun.* 66(10):4588-92 (1998)). Se pueden utilizar métodos similares para eliminar grupos *N*-acetilo. Para mantener niveles elevados de *O*-acetilación en los polisacáridos capsulares de tipo 5 y/u 8, se minimizan los tratamientos que dan lugar a la hidrólisis de los grupos *O*-acetilo, por ejemplo, tratamientos en extremos de pH.

Los polisacáridos capsulares se pueden purificar mediante técnicas conocidas tal como se describe en las referencias en la presente. Un proceso típico conlleva la inactivación con fenol-etanol de células de *S. aureus*, centrifugación, tratamiento con lisostafina, tratamiento con ARNasa/ADNasa, centrifugación, diálisis, tratamiento con proteasas, diálisis adicional, filtración, precipitación con etanol/CaCl₂, diálisis, liofilización, cromatografía de intercambio aniónico, diálisis, liofilización, cromatografía de exclusión por tamaños, diálisis y liofilización (Fattom *et al. Infect Immun.* 58(7), 2367-74 (1990)). Un proceso alternativo conlleva el tratamiento en autoclave de las células de *S. aureus*, la ultrafiltración del sobrenadante que contiene polisacáridos, concentración, liofilización, tratamiento con metaperyodato sódico para eliminar ácido teicoico, ultrafiltración adicional, diafiltración, cromatografía líquida de exclusión de tamaños de alta resolución, diálisis y liofilización (Gilbert *et al. J. Microb. Meth.* 20, 39-46 (1994)). No obstante, la invención no se limita a polisacáridos purificados a partir de fuentes naturales y los polisacáridos se pueden obtener por otros métodos tales como síntesis total o parcial.

Otros polisacáridos capsulares bacterianos

Algunos polisacáridos capsulares bacterianos ilustrativos adicionales incluyen los de *Haemophilus influenzae* Tipo b, *Salmonella enterica* Typhi Vi y *Clostridium difficile*.

Carbohidrato de *S. agalactiae*: Se pueden utilizar también polisacáridos bacterianos no capsulares. Un polisacárido bacteriano no capsular ilustrativo es el carbohidrato GAS de *S. pyogenes* (también conocido como el polisacárido de

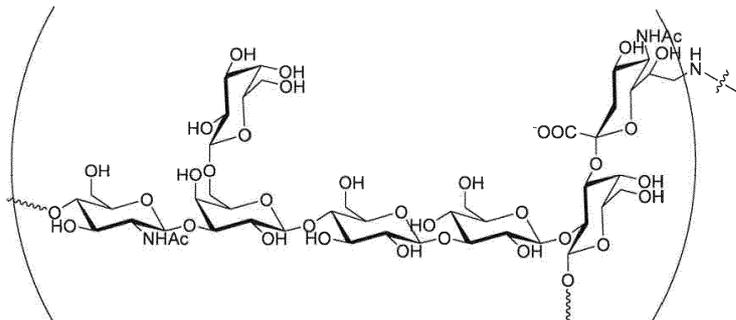
la pared celular GAS, o GASP). Este polisacárido presenta una estructura ramificada con un esqueleto de *L*-ramnopiranososa (Rhap) compuesto por enlaces alfa-(1→2) y alfa-(1→3) alternos y residuos de *D-N*- acetilglucosamina (GlcPNAc) beta-(1→3) conectados a anillos de ramnosa alternos (Kreis *et al. Int J Biol Macromol.* 17(3-4), 117-30 (1995)).

5 El carbohidrato GAS se encontrará generalmente en su forma nativa, pero puede haber sido modificado. Por ejemplo, el polisacárido puede ser más corto que el carbohidrato GAS nativo, o se puede modificar químicamente.

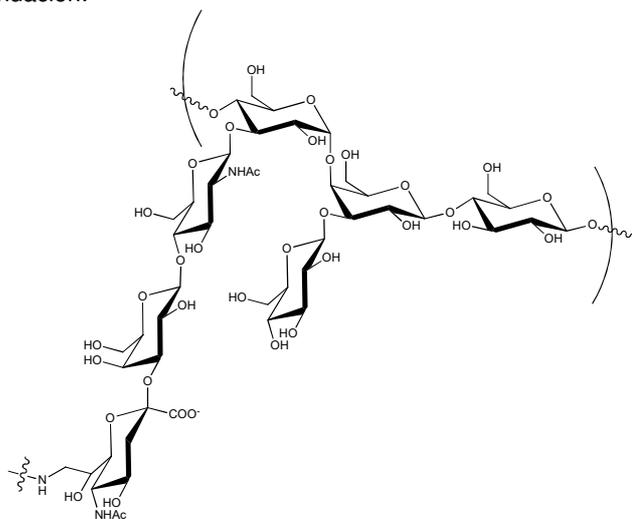
10 Por tanto, el polisacárido utilizado de acuerdo con la invención puede ser un carbohidrato GAS de longitud sustancialmente completa, tal como se encuentra en la naturaleza, o puede ser más corto que la longitud natural. Los polisacáridos de longitud completa se pueden despolimerizar para proporcionar fragmentos más cortos para su uso con la invención, por ejemplo, mediante hidrólisis en ácido débil, mediante calentamiento, mediante cromatografía de dimensionamiento, etc. Un fragmento corto que se cree que corresponde con la unidad terminal en el carbohidrato GAS se ha propuesto para su uso en una vacuna (Hoog *et al., Carbohydr Res.* 337(21-23), 2023-36 (2002)). Por
15 consiguiente, se contemplan fragmentos cortos en la presente invención. Sin embargo, se prefiere utilizar polisacáridos de longitud sustancialmente completa. El carbohidrato GAS habitualmente tiene un peso molecular promedio ponderado de aproximadamente 10 kDa, en particular, aproximadamente 7,5-8,5 kDa. Las masas moleculares se pueden medir por HPLC, por ejemplo, SEC-HPLC utilizando una columna TSK Gel G3000SW (Sigma) en relación con estándares de pululano tales como los disponibles de Polymer Standard Service (www. Polymer.de).

20 El polisacárido se puede modificar químicamente respecto al carbohidrato GAS tal como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el polisacárido se puede des-*N*-acetilar (parcial o totalmente), *N*-propionar (parcial o totalmente), etc. El efecto de la desacetilación, etc., por ejemplo, en la inmunogenicidad, se puede evaluar mediante ensayos rutinarios.

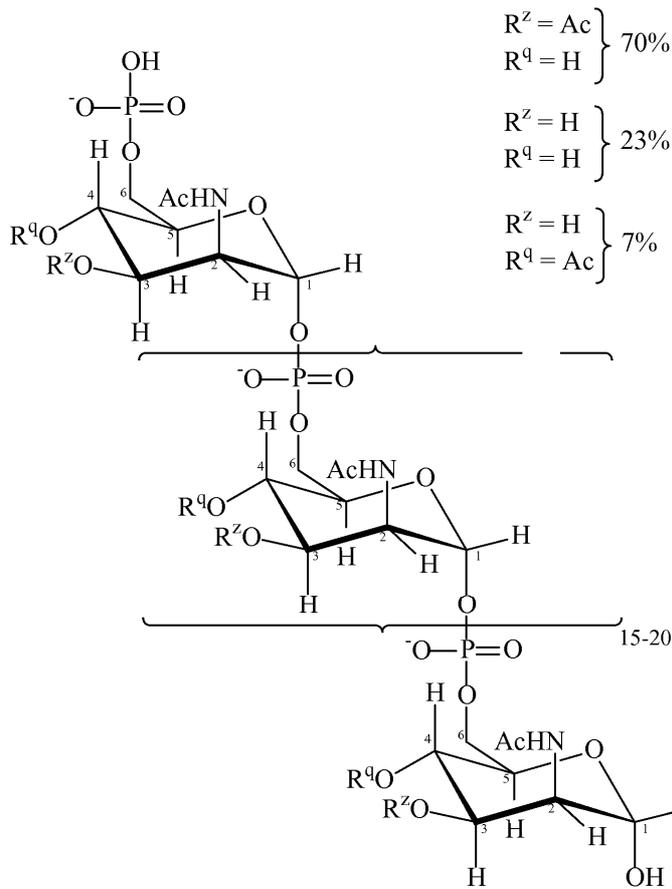
25 En algunas realizaciones, el polisacárido es polisacárido antigénico GBSII que tiene la estructura mostrada a continuación:



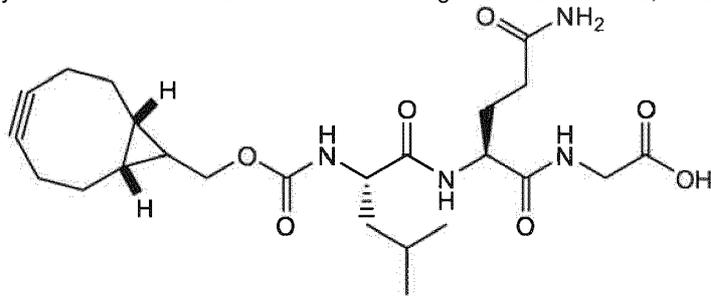
30 En algunas realizaciones, el polisacárido es polisacárido antigénico GBSV que tiene la estructura mostrada a continuación:



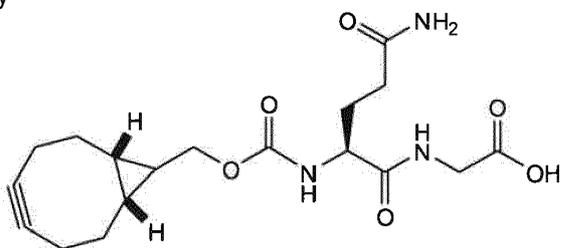
En algunas realizaciones, el polisacárido es polisacárido antigénico MenA que tiene la estructura mostrada a continuación:



En otro aspecto, se divulgan compuestos de la fórmula (I) $R^1\text{-(Leu)}_x\text{-Gln-(Gly)}_y\text{-(A-W-B-R}^2)_z$ donde x, y, z, R^1, R^2, A, B y W se han definido anteriormente. En algunas realizaciones, los compuestos son cualquiera de:



5 y



10 En las realizaciones que tienen un grupo cicloalquino de ocho miembros, ese grupo se puede unir al grupo modificador mediante unión covalente. Habitualmente, el grupo cicloalquino de ocho miembros se une mediante un espaciador y en el extremo del espaciador. El otro extremo del espaciador tiene un grupo funcional para la unión al grupo modificador a través del extremo amino o ácido carboxílico del péptido, pero no en el grupo ϵ -amino de la glutamina. Por ejemplo, si la unión va a ser en la parte amina del grupo modificador, entonces el espaciador puede incluir cualquier grupo funcional que permita la unión a una amina (p. ej., un éster succinimídico). De forma similar, si la unión va a

ser en la parte ácido carboxílico del grupo modificador, entonces el espaciador puede incluir cualquier grupo funcional que permita la unión a un ácido carboxílico (p. ej., una amina).

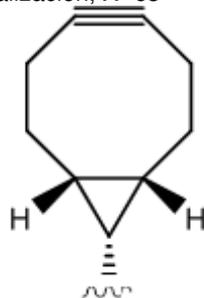
5 En algunas realizaciones, el grupo cicloalquino de ocho miembros se fusiona a uno o más sistemas anulares diferentes tales como ciclopropano. En una realización preferida, el grupo cicloalquino de ocho miembros se fusiona con un grupo ciclopropano. En la mayoría de las realizaciones preferidas, el grupo cicloalquino de ocho miembros es un grupo ciclooctino.

10 En una realización, la unión se lleva a cabo utilizando un compuesto que tiene la fórmula X^1-L-X^2 , donde X^1 es el grupo cicloalquino de ocho miembros y X^2-L es el espaciador. En estas realizaciones, X^2 puede ser cualquier grupo que pueda reaccionar con un grupo funcional en el grupo amino sobre el péptido, y L es un resto de unión en el espaciador.

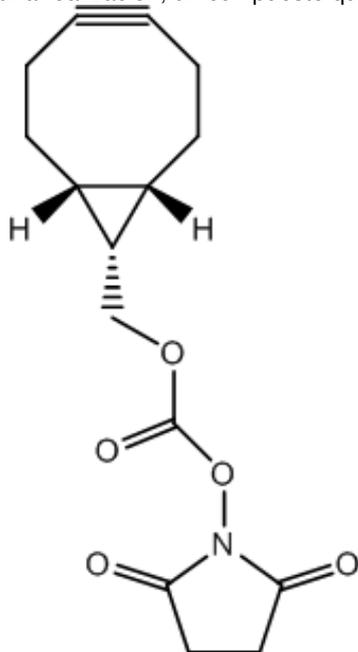
15 En una realización, X^2 es *N*-oxisuccinimida. Este grupo es adecuado para la unión a una amina en un péptido. L puede ser un alquilo de cadena lineal con de 1 a 10 átomos de carbono (p. ej., $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$), p. ej., $(CH_2)_4$ o $(CH_2)_3$. L habitualmente tiene la fórmula $-L^3-L^2-L^1$, en la que L^1 es carbonilo, L^2 es un alquilo de cadena lineal con de 1 a 10 átomos de carbono (p. ej., $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$), p. ej., $(CH_2)_4$ o $(CH_2)_5$ o L^2 está ausente, y L^3 es $-NHC(O)-$, carbonilo o $-O(CH_3)-$.

20 En una realización, L^1 es carbonilo, L^2 es $(CH_2)_5$ y L^3 es $-NHC(O)-$. En otra realización, L^1 es carbonilo, L^2 es $(CH_2)_4$ y L^3 es carbonilo. En otra realización, L^1 es carbonilo, L^2 está ausente y L^3 es $-O(CH_3)-$.

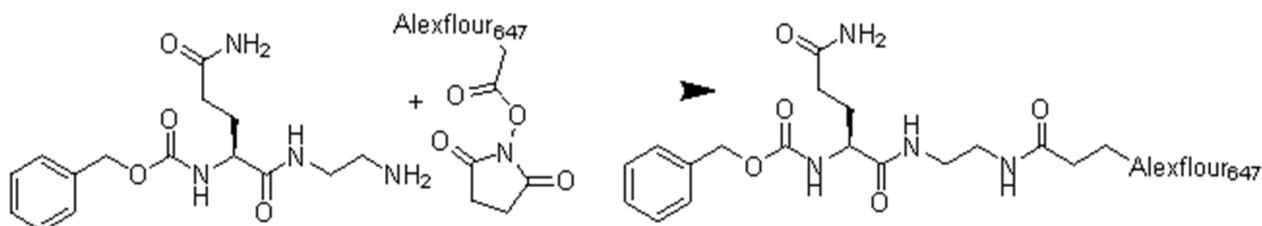
En una realización, X^1 es



En una realización, un compuesto que tiene la fórmula X^1-L-X^2 es



25 Cuando el grupo R^2 incluye un fluoróforo, los grupos fluoróforos adecuados se pueden preparar de acuerdo con técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, tal como se muestra en el Esquema I, se ilustra un protocolo general para preparar un grupo modificador funcionalizado con un fluoróforo.

Esquema I.5 Proteínas diana

Un compuesto diana puede ser uno que sea un sustrato para transglutaminasa microbiana, por ejemplo, proteínas que son sustratos para la transglutaminasa microbiana. En un aspecto, el compuesto diana contiene al menos un residuo de Lys y, en algunas realizaciones, al menos dos residuos de Lys. Si un compuesto diana no es un sustrato de transglutaminasa *per se*, es posible insertar uno o más residuos de Gln o Lys, y en particular, residuos de Lys en la proteína para convertir la proteína en un sustrato para transglutaminasa. Como alternativa, se puede insertar una secuencia peptídica que contenga un residuo de lisina (una etiqueta peptídica). En principio, dicho residuo de Gln o Lys se puede insertar en cualquier posición en la secuencia. Habitualmente, la inserción debería ser en una parte accesible de la proteína o en un bucle flexible. También se puede insertar en una posición en la que la actividad fisiológica tal como la actividad terapéutica de la proteína no se vea afectada hasta un grado en el que la proteína ya no sea útil, p. ej., en una intervención terapéutica. Las inserciones de residuos de aminoácidos en las proteínas se puede conseguir mediante técnicas estándar conocidas para los expertos en la técnica tales como técnicas transgénicas o de modificación química posterior a la traducción.

20 Cualquier compuesto o proteína diana que sea un sustrato para la transglutaminasa se puede modificar por los métodos divulgados en la presente tales como, por ejemplo, enzimas, hormonas proteicas, factores de crecimiento, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, citocinas, receptores, linfocinas y antígenos de vacunas. En algunas realizaciones, el polipéptido es un péptido antigénico.

a
25 En algunas realizaciones, particularmente cuando R es un polisacárido, el polipéptido es una molécula portadora. En general, la conjugación covalente de los polisacáridos a los portadores potencia la inmunogenicidad de los polisacáridos a medida que los convierte de antígenos independientes de T a antígenos dependientes de T, lo que permite de este modo una fase de preparación para la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para las vacunas pediátricas (remítase, por ejemplo, a Ramsay *et al.*, *Lancet* 357(9251): 195-196 (2001)) y es una técnica muy conocida (remítase a las revisiones en Lindberg *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36 (1999), Buttery & Moxon, *J R Coll Physicians Lond* 34, 163-168 (2000), Ahmad & Chapnick, *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii (1999), Goldblatt *J. Med. Microbiol.* 47, 563-567 (1998), la patente europea 477 508, la Patente de EE. UU. n.º 5 306 492, el documento WO98/42721, Dick *et al. Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basilea, 10, 48-114 (1989) y Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.

35 La proteína portadora puede ser un toxoide de una toxina bacteriana. Las proteínas portadoras útiles incluyen toxinas o toxoides bacterianos tales como toxoide de difteria o toxoide de tétanos, toxinas de difteria y cólera y sus subunidades tales como el fragmento C del toxoide del tétanos y la mutación CRM197 de la toxina de difteria. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana externa de *N.meningitidis*, péptidos sintéticos, proteínas de choque térmico, proteínas pertussis, citocinas, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, seroalbúmina humana (incluida la recombinante), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de linfocitos T CD4+ humanos de varios antígenos derivados de patógenos tales como N19, proteína D de *H.influenzae*, proteína de la superficie de pneumococos PspA, pneumolisina, proteínas de captación de hierro, toxina A o B de *C.difficile*, exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (rEPA), una proteína GBS, etc. En algunas realizaciones, la proteína diana es una proteína pilus tal como una proteína GBS, por ejemplo, GBS67 y GBS80.

Derivatización adicional

50 Puede surgir la necesidad de modificar las proteínas diana de la presente invención (es decir, proteínas de interés) por cualquier serie de razones, y esto también se refleja en los tipos de compuestos que se pueden modificar selectivamente de acuerdo con los métodos de la presente invención.

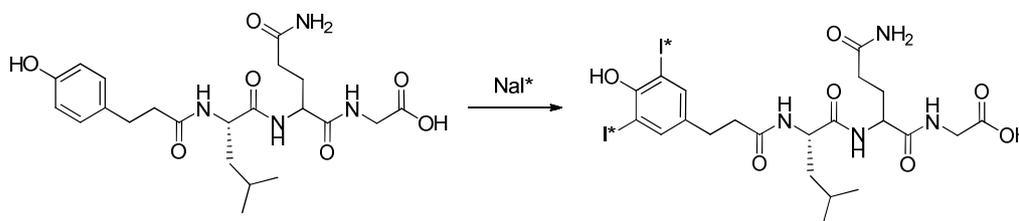
55 Por lo general, los métodos de la invención comprenden una reacción catalizada por transglutaminasa microbiana de una proteína que contiene al menos dos lisinas con un péptido que contiene glutamina de la fórmula (I) R¹-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R²)_z.

En una realización, el método consta de los siguientes pasos: (a) preparación mediante síntesis peptídica de un compuesto de la fórmula (I) $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$ y purificación tal como se conoce en la técnica; (b) mezcla de un exceso de este compuesto $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$ con una proteína diana que contiene al menos una lisina, y en algunas realizaciones, más de una lisina, en un tampón acuoso, que contiene opcionalmente un disolvente orgánico, detergente u otro modificador; (c) adición a esta mezcla de una cantidad catalítica de transglutaminasa microbiana; (d) se puede añadir opcionalmente un inhibidor de mTGasa a la mezcla; (e) la mezcla se somete a un proceso de purificación, que comprende habitualmente una operación unitaria tal como ultra- o diafiltración y/o cromatografía (intercambio iónico, exclusión por tamaños, interacción hidrófoba, etc.). Se obtiene de ese modo una proteína modificada selectivamente. La proteína se caracteriza mediante métodos analíticos de proteínas estándar, que incluyen cromatografía, electroforesis, mapeado peptídico y espectroscopía de masas.

Opcionalmente, a continuación de los pasos (b) o (c), la proteína modificada se puede modificar adicionalmente a través de los grupos funcionales de R^1 o R^2 o ambos, si se encuentran presentes, por ejemplo, con una marca de tipo fluoróforo (a menos que ya haya una presente). Si se añade una marca, la proteína modificada se puede detectar utilizando una variedad de técnicas dependiendo de la naturaleza de la marca tal como fluorescencia o radiomarcaje.

En algunas realizaciones, los grupos funcionales de R^1 o R^2 o ambos pueden estar radiomarcados. Por ejemplo, se puede añadir radiomarcaje con yodo a un conector tal como se muestra en el Esquema II.

Esquema II.



Como parte del mecanismo de la transamidación mediada por mTGasa, se forma un tioéster intermolecular mediante reacción entre una Cys en el sitio activo de la mTGasa y el sustrato de Gln. Se pretende que el término «transamidación» indique una reacción en la que el nitrógeno en la cadena lateral de la glutamina se intercambie con nitrógeno de otro compuesto, en particular, nitrógeno de otro nucleófilo que contenga nitrógeno. Este intermedio se puede considerar como un residuo de Gln activado, siendo la especie activa un tioéster de mTGasa, que reacciona con aminas, por ejemplo, un residuo de lisina proteico. La selectividad de la reacción es una consecuencia de 1) el volumen estérico absoluto del tioéster de mTGasa mientras interacciona con el sustrato proteico que porta Lys y 2) las interacciones no covalentes más definidas entre el tioéster de mTGasa y el sustrato proteico que porta Lys. Una consecuencia inmediata de esto es que las proteínas que portan grupos acilo activados, proteína-X-acilo, donde X es un átomo o grupo que activa el grupo acilo frente al ataque nucleófilo por parte de una amina de lisina proteica, se incluyen en la invención.

Por tanto, puede ser deseable modificar las proteínas para alterar las propiedades fisicoquímicas de la proteína tales como, p. ej., aumentar (o disminuir) la solubilidad para modificar la biodisponibilidad de las proteínas terapéuticas. En otra realización, puede ser deseable modificar la velocidad de eliminación en el cuerpo conjugando compuestos a la proteína que se une a proteínas plasmáticas tales como, por ejemplo, albúmina, o que aumentan el tamaño de la proteína para evitar o retrasar la expulsión a través de los riñones. La conjugación también puede alterar y, en particular, disminuir la susceptibilidad de una proteína a la hidrólisis tal como, por ejemplo, la proteólisis *in vivo*.

En otra realización, puede ser deseable conjugar una marca para facilitar el análisis de la proteína. Los ejemplos de dichas marcas incluyen isótopos radiactivos, marcadores fluorescentes tales como los fluoróforos ya descritos y los sustratos enzimáticos.

En otra realización más, un compuesto se conjuga con una proteína para facilitar el aislamiento de la proteína. Por ejemplo, se puede conjugar a la proteína un compuesto con una afinidad específica por un material de una columna particular. También puede ser deseable modificar la inmunogenicidad de una proteína, por ejemplo, conjugando una proteína para ocultar, enmascarar o eclipsar uno o más epítopos inmunogénicos en la proteína. Se pretende que el término «conjugado», como sustantivo, indique un péptido modificado, es decir, un péptido con un resto unido a él para modificar las propiedades de dicho péptido. Como verbo (conjugar), se pretende que el término indique el proceso de unir un resto a un péptido para modificar las propiedades de dicho péptido.

En una realización, la invención proporciona un método para mejorar las propiedades farmacológicas de las proteínas diana. La mejora es con respecto a la proteína sin modificar correspondiente. Algunos ejemplos de tales propiedades farmacológicas incluyen semivida *in vivo* funcional, inmunogenicidad, filtración renal, protección frente a proteasas y unión a albúmina de cualquier proteína específica.

En un aspecto, las proteínas modificadas de la invención se pueden modificar adicionalmente mediante derivatización adicional de R¹ y/o (A-W-B-R²)_z. Específicamente, R¹ y/o R² pueden comprender un grupo químico adecuado para una modificación adicional. Los ejemplos de dicha funcionalización adicional incluyen cicloadición de azida-alquino de Huisgen, más comúnmente conocida como química click, si R¹ o R² incluye un grupo azida o ciclooctino. Si R² incluye la tosil sulfona que experimenta eliminación para formar una cetona α,β-insaturada, se podría aplicar la adición conjugada para una modificación adicional utilizando un nucleófilo tal como un tiol.

En algunas realizaciones ya descritas anteriormente, W se puede seleccionar entre: dendrímero, óxido de polialquileno, polialquilenglicol (PAG), polietilenglicol (PEG/polipropilenglicol (PPG), PEG ramificados, alcohol polivinílico (PVA, policarboxilato, polivinilpirrolidona, anhídrido de ácido maleico-co-poliestireno, anhídrido de ácido málico-co-poliestireno, dextrina, carboximetildextrano, ligandos de unión a proteínas séricas tales como compuestos que se unen a albúmina tales como ácidos grasos, ácido graso C₅-C₂₄, diácido alifático (por ejemplo, C₅-C₂₄), una estructura (por ejemplo, derivados de ácido siálico o miméticos) que inhiben la unión de glicanos a los receptores (por ejemplo, receptor de asialoglicoproteína y receptor de manosa), una molécula orgánica de bajo peso molecular que contiene restos que altera las condiciones fisiológicas, altera las propiedades de carga tales como ácidos carboxílicos o aminas, o sustituyentes neutros que evitan el reconocimiento específico de glicanos tales como sustituyentes alquilo menores (por ejemplo, alquilo C₁-C₅), un radical cargado orgánico de bajo peso molecular (por ejemplo, C₁-C₂₅), que puede contener uno o más ácidos carboxílicos, aminas, ácidos sulfónicos, fosfónicos o una combinación de estos, una molécula hidrófila neutra de bajo peso molecular (por ejemplo, C₁-C₂₅), tal como ciclodextrina o una cadena de polietileno que puede estar opcionalmente ramificada, polietilenglicol con un peso molecular promedio de 2-40 KDa; un polímero de precisión bien definido tal como un dendrímero con una masa molecular exacta que oscila de 700 a 20 000 Da, o más preferentemente de entre 700-10 000 Da; y un polipéptido sustancialmente no inmunogénico tal como albúmina o un anticuerpo o parte de un anticuerpo que contiene opcionalmente un dominio Fc.

En una realización, W es un polietilenglicol lineal o ramificado que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 10 000 uma, también denominado «PEG». Se pretende que el término «PEG» indique polietilenglicol, que incluye análogos de este, por ejemplo, donde un grupo OH terminal ramificado se ha reemplazado por un grupo alcoxi tal como un grupo metoxi, un grupo etoxi o un grupo propoxi.

Debido al proceso para producir mPEG, estas moléculas a menudo tienen una distribución de pesos moleculares. Esta distribución se describe con el índice de polidispersidad. La expresión «índice de polidispersidad», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la proporción entre el peso molecular promedio ponderado y el peso molecular promedio numérico, tal como se conoce en la técnica de la química de polímeros (remítase, por ejemplo, a «Polymer Synthesis and Characterization», J.A. Nairn, Universidad de Utah, 2003). El índice de polidispersidad es un número que es superior o igual a uno, y se puede estimar a partir de los datos cromatográficos de permeación en gel. Cuando el índice de polidispersidad es 1, el producto es monodisperso y, por tanto, constituido por compuestos con un único peso molecular. Cuando el índice de polidispersidad es superior a 1, es una medida de la polidispersidad de ese polímero, es decir, la amplitud de la distribución de polímeros con diferentes pesos moleculares.

El uso de, por ejemplo, «mPEG2000» en fórmulas, nombres de compuestos o en estructuras moleculares, indica un residuo de mPEG donde mPEG es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 2000 Da.

El índice de polidispersidad habitualmente aumenta con el peso molecular del PEG o mPEG. Cuando se hace referencia a PEG de 2000 Da y, en particular, mPEG de 2000 Da, se pretende indicar un compuesto (o, de hecho, una mezcla de compuestos) con un índice de polidispersidad inferior a 1,06, tal como inferior a 1,05, tal como inferior a 1,04, tal como inferior a 1,03, tal como entre 1,02 y 1,03. Cuando se hace referencia a PEG de 3000 Da y, en particular, mPEG de 3000 Da, se pretende indicar un compuesto (o, de hecho, una mezcla de compuestos) con un índice de polidispersidad inferior a 1,06, tal como inferior a 1,05, tal como inferior a 1,04, tal como inferior a 1,03, tal como entre 1,02 y 1,03.

En algunas realizaciones, los métodos anteriores incluyen también un paso para controlar el ambiente de pH de la proteína a un pH superior a 7; y poner en contacto la proteína marcada con selectividad por un sitio con un péptido que tiene un residuo de cisteína. En algunas realizaciones, el péptido que tiene un residuo de cisteína es N⁵-((R)-1-((carboximetil)amino)-3-mercapto-1-oxopropan-2-il)-L-glutamina. En algunas realizaciones, el péptido que tiene un residuo de cisteína se puede sustituir con cualquier molécula que contenga tiol tal como polisacáridos con tioles, compuestos citotóxicos con tioles, PEG funcionalizados con tiol y similares.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína modificada por cualquiera de los métodos divulgados en la presente. En un aspecto, una composición farmacéutica de este tipo comprende una proteína modificada tal como una hormona del crecimiento (GH), que se encuentra presente en una concentración de 10-15 mg/mL a 200 mg/mL, tal como, por ejemplo, de 10-10 mg/mL a 5 mg/mL y donde la composición tiene un pH de 2,0 a 10,0. La composición puede comprender además un sistema tampón, uno o varios conservantes, uno o varios

agentes de tonicidad, uno o varios agentes quelantes, estabilizantes y tensioactivos. En una realización, la composición farmacéutica es una composición acuosa. Dichas composiciones habitualmente existen en forma de solución o suspensión. En una realización adicional, la composición farmacéutica es una solución acuosa. La expresión «composición acuosa» se define como una composición que comprende al menos un 50% p/p de agua. Del mismo modo, la expresión «solución acuosa» se define como una solución que comprende al menos un 50% p/p de agua, y la expresión «suspensión acuosa» se define como una suspensión que comprende al menos un 50% p/p de agua.

En otra realización, la composición farmacéutica es una composición liofilizada, a la cual un facultativo, paciente o farmacéutico añade disolventes y/o diluyentes antes del uso. En otra realización, la composición farmacéutica es una composición seca (por ejemplo, liofilizada o secada por pulverización) lista para su uso sin ninguna disolución anterior.

En un aspecto adicional, una composición farmacéutica que comprende una solución acuosa de una proteína modificada tal como, por ejemplo, una proteína GH modificada, y un tampón, donde la proteína modificada tal como, por ejemplo, la proteína GH modificada se encuentra presente en una concentración de 0,1-100 mg/mL o superior, y donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

En otra realización, el pH de la composición se selecciona de la lista constituida por 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, y 10,0.

En una realización adicional, el tampón se selecciona entre bicarbonato amónico, acetato sódico, carbonato sódico, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato sódico, hidrogenofosfato disódico, fosfato sódico y tris(hidroximetil)aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico, TRIS o mezclas de estos.

En una realización adicional, la composición también puede incluir un conservante farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el conservante puede ser fenol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, *p*-hidroxibenzoato de metilo, *p*-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, *p*-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, dehidroacetato de sodio, clorocresol, *p*-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3*p*-clorofenoxipropano-1,2-diol), o mezclas de estos. El conservante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/mL a 20 mg/m o de 0,1 mg/mL a 5 mg/mL. En una realización adicional, el conservante está presente en una concentración de 5 mg/mL a 10 mg/mL o de 10 mg/mL a 20 mg/mL.

En una realización adicional, la composición puede incluir un agente isotónico. En una realización adicional, el agente isotónico se selecciona entre una sal (p. ej., cloruro sódico), un azúcar o alcohol de un azúcar, un aminoácido (p. ej., L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej., glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (p. ej., PEG400) o mezclas de estos. Se puede utilizar cualquier azúcar tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluidos, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización, el aditivo de tipo azúcar es sacarosa. Un alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C₄-C₈ que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, arabitol y mezclas de estas. En una realización, el aditivo de tipo alcohol de azúcar es manitol. En una realización adicional, la concentración de azúcar o alcohol de azúcar se encuentra entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 150 mg/mL o de 1 mg/mL a 50 mg/mL. El agente isotónico puede estar presente en una concentración de 1 mg/mL a 7 mg/mL o de 8 mg/mL a 24 mg/mL o de 25 mg/mL a 50 mg/mL. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es muy conocido para el experto. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 201.^a edición, 2000.

En el presente contexto, se pretende que la expresión «sal farmacéuticamente aceptable» indique sales que no son perjudiciales para el paciente. Dichas sales incluyen sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, sales de metales farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y amonio alquilado. Las sales de adición de ácidos incluyen sales de ácidos inorgánicos así como ácidos orgánicos. Algunos ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico y similares. Algunos ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetilenoalicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, *p*-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico y similares. Algunos ejemplos adicionales de sales de adición de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas en *J. Phann. Sci.* 1977, 66, 2. Los ejemplos de sales de metales incluyen sales de litio, sodio, potasio, magnesio y similares. Los ejemplos de sales de amonio y amonio alquilado incluyen sales de amonio,

metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio y similares.

5 En una realización adicional, la composición incluye un agente quelante. El agente quelante se selecciona entre sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de estos. El agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/mL a 5 mg/mL, de 0,1 mg/mL a 2 mg/mL, o de 2 mg/mL a 5 mg/mL. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es muy conocido para el experto. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20.^a edición, 2000.

10 En una realización adicional, la composición incluye un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es muy conocido para el experto. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20.^a edición, 2000. Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen una proteína que posiblemente presenta formación de agregados durante el almacenamiento en composiciones farmacéuticas líquidas.
15 Por «formación de agregados» se entiende una interacción física entre las moléculas de proteína que da como resultado la formación de oligómeros, que pueden continuar siendo solubles, o agregados visibles grandes que precipitan desde la solución. Se pretende que la expresión «durante el almacenamiento» se refiera a que una composición farmacéutica líquida o composición una vez preparada, no se administra directamente a un sujeto. En cambio, después de la preparación, se envasa para su almacenamiento, en una forma líquida, en un estado congelado
20 o en una forma seca para su reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Se pretende que la expresión «forma seca» se refiera a que la composición farmacéutica líquida o composición se seca por liofilización (es decir, liofilización, remítase, por ejemplo, a Williams y Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59), secado por pulverización (remítase a Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5.^a ed; Longman Scientific and Technical, Essex, R.U.), págs. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) *Drug Devel. Ind. Phann.* 18:1169-1206; y Mumenthaler *et al.* (1994) *Phann. Res.* 11:12-20), o secado con aire (Carpenter y Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). La formación de agregados por parte de una proteína durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar de forma adversa a la actividad biológica de esa proteína, lo que da lugar a la pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como bloqueo de tubos, membranas o bombas
30 cuando la composición farmacéutica que contiene proteína se administra utilizando un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir una cantidad de una base de aminoácido suficiente para reducir la formación de agregados por parte de la proteína durante el almacenamiento de la composición. Se pretende que la expresión «base de aminoácido» se refiera a un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde
35 cualquier aminoácido concreto se encuentra presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se utiliza una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos se pueden encontrar presentes en sus formas de base libre, todos se pueden encontrar presentes en sus formas de sal, o algunos se pueden encontrar presentes en sus formas de base libre mientras que otros se encuentran presentes en sus formas de sal. En una realización, los aminoácidos a utilizar en la preparación de las composiciones de la invención son los que portan una cadena lateral cargada tales
40 como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, isómero L o D, o mezclas de estos) de un aminoácido particular (metionina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de estos) o combinaciones de estos estereoisómeros o glicina o una base orgánica tal como, sin carácter limitante, imidazol, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas siempre que la base orgánica o de aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o su forma de sal. En una realización, se utiliza el estereoisómero L de un aminoácido. En una realización, se utiliza el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos. Se pretende que la expresión «análogo de aminoácido» se refiera a un derivado del aminoácido natural que produce el efecto deseado de reducir la formación de agregados por parte de la proteína durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y *N*-monoetil-L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen *S*-metil-L-cisteína. Como con los demás aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan a las composiciones en su forma de base libre o su forma de sal. En una realización adicional, los aminoácidos o análogos de aminoácidos se utilizan en una concentración, que es suficiente para evitar o retrasar la agregación de la proteína.

55 En una realización adicional, se puede añadir metionina (u otros aminoácidos con azufre) o aminoácidos análogos, para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a sulfóxido de metionina cuando la proteína que actúa como agente terapéutico es una proteína que comprende al menos un residuo de metionina susceptible de dicha oxidación. Por «inhibir» se entiende una acumulación mínima de especies oxidadas de metionina a lo largo del tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina da como resultado una mayor retención de la proteína en su forma molecular adecuada. Se puede utilizar cualquier estereoisómero de metionina (isómero L o D) o cualesquiera combinaciones de estos. La cantidad que se ha de añadir debería ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Habitualmente, esto significa que la composición no contiene más de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 30% de sulfóxido de metionina. Por lo general, esto se puede obtener añadiendo metionina de modo que la

proporción de metionina añadida a lo residuos de metionina oscile desde aproximadamente 1: 1 hasta aproximadamente 1000: 1, tal como 10: 1 hasta aproximadamente 100: 1.

5 En una realización adicional, la composición puede incluir un estabilizante seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. El estabilizante se puede seleccionar entre polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de estos (p. ej., HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol, y diferentes sales (p. ej., cloruro sódico).

10 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir agentes estabilizantes adicionales, que potencian adicionalmente la estabilidad de una proteína terapéuticamente activa en ellas. Los agentes estabilizantes incluyen, sin carácter limitante, metionina y EDTA, que protegen la proteína frente a la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege la proteína frente a la agregación asociada con la descongelación o el cizallamiento mecánico.

15 En una realización adicional, la composición también incluye un tensioactivo. El tensioactivo se puede seleccionar entre un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácidos grasos y sorbitán, polímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (p. ej., poloxámeros tales como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácidos grasos y sorbitán polioxietileno, derivados de polioxietileno y polietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, p. ej., Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35),
 20 monoglicéridos o derivados etoxilados de estos, diglicéridos o derivados polioxietilenados de estos, alcoholes, glicerol, lecitinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (p. ej., ácido dipalmitoilfosfatídico) y lisofosfolípidos (p. ej., palmitoil-lisofoafatidil-L-serina y ésteres 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxi (éter alquílico) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo,
 25 derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir, colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol y los DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina cargados positivamente, y glicerofosfolípidos (p. ej., cefalinas), gliceroalcolípidos (p. ej., galactopiranosido), esfingoglicolípidos (p. ej., ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (p. ej., taurodihidrofusidato de sodio, etc), ácidos grasos de cadena larga y sales de estos C₆-C₁₂ (p. ej., ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N^o acilados de lisina, arginina o histidina o derivados con cadena lateral acilada de lisina o arginina, derivados N^o acilados de disproteínas que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N^o acilado de una triproteína que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, n.º de registro CAS [577-11-7]), docusato de calcio, n.º de registro CAS [128-49-4]), docusato de potasio, n.º de registro CAS [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato sódico o laurilsulfato sódico), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados de estos, ácidos biliares y sales de estos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, *N*-hexadecil-*N,N*-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes amomc (alquilarilsulfonatos), tensioactivos zwitteriónicos (p. ej., *N*-alquil-*N,N*-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (p. ej., bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (p. ej., P-D-glucopiranosido de dodecilo), poloxaminas (p. ej., de Tetric), que son copolímeros de bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo se puede seleccionar del grupo de derivados de imidazolina o mezclas de estos.

45 El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es muy conocido para el experto. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20.^a edición, 2000.

50 Es posible que se encuentren presentes otros ingredientes en la composición farmacéutica. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes espesantes, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej., seroalbúmina, gelatina o proteínas humanas) y un zwitterión (p. ej., un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar de forma adversa la estabilidad global de la composición farmacéutica.

55 Se pueden administrar composiciones farmacéuticas que contienen una proteína modificada tal como, p. ej., una proteína GH modificada, a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios lugares, por ejemplo, en lugares tópicos, por ejemplo, lugares de la piel y las mucosas, en lugares que eluden la absorción, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en lugares que conllevan absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

60 La administración de composiciones farmacéuticas puede ser a través de varias rutas de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o una combinación de estos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo, a través de la conjuntiva, uretral y parenteral a pacientes que necesitan un tratamiento de este tipo.

Las composiciones se pueden administrar en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, ungüentos, pastas, escayolas, pomadas, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, espráis, polvo, aerosoles, inhalantes, gotas oftálmicas, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, solución para inyección, soluciones de transformación *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, fijación *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, solución para infusión e implantes.

Las composiciones de la invención se pueden además combinar, o unirse, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, a un portador de fármacos, sistema de suministro de fármacos y sistema de suministro de fármacos avanzado con el fin de aumentar adicionalmente la estabilidad de la proteína GH modificada, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr una cronoterapia muy conocida para los expertos en la técnica, y aumentar el cumplimiento del paciente, o cualquier combinación de estos. Algunos ejemplos de portadores, sistemas de suministro de fármacos y sistemas de suministro de fármacos avanzados incluyen, sin carácter limitante, polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, alcohol polivinílico, polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de bloque de estos, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas termogelificantes, por ejemplo, sistemas copoliméricos de bloque muy conocidos para los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanoparticulados, cristales líquidos y dispersiones de estos, fase L2 y dispersiones de esta, muy conocidas para los expertos en la técnica de comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionante, automicroemulsionante, ciclodextrinas y derivados de estas, y dendrímeros.

Las composiciones son útiles en la composición de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para la administración pulmonar de una proteína modificada tal como, p. ej., una proteína GH modificada, utilizando, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos dispositivos muy conocidos para los expertos en la técnica.

Usos terapéuticos de las proteínas modificadas

En la medida en que la proteína sin modificar es una proteína terapéutica, la invención también se refiere al uso de las proteínas modificadas en terapia, y en particular a composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas modificadas. Por tanto, tal como se utiliza en la presente, el término «tratamiento» y la expresión «que trata» se refieren al control y al cuidado de un paciente con la finalidad de combatir una afección tal como una enfermedad o un trastorno. Se pretende que el término incluya el espectro completo de tratamientos para una afección determinada que el paciente padece tal como la administración del compuesto activo con el fin de aliviar los síntomas o complicaciones, con el fin de retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, con el fin de aliviar o calmar los síntomas y complicaciones, y/o con el fin de curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección, así como para prevenir la afección, donde la prevención se debe entender como el control y el cuidado de un paciente con el fin de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para evitar la aparición de los síntomas o complicaciones. El paciente a tratar es preferentemente un mamífero, en particular, un ser humano, pero también puede incluir animales tales como perros, gatos, vacas, ovejas y cerdos. No obstante, se debería reconocer que los regímenes terapéuticos y regímenes profilácticos (preventivos) representan aspectos separados para los usos divulgados en la presente y contemplados por el facultativo o veterinario a cargo del tratamiento.

Una «cantidad terapéuticamente eficaz» de una proteína modificada tal como se utiliza en la presente se refiere a una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad determinada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como «cantidad terapéuticamente eficaz». Las cantidades terapéuticamente eficaces para cada finalidad dependerán, por ejemplo, de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso, sexo, edad y estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosis apropiada se puede conseguir utilizando experimentación rutinaria, construyendo una matriz de valores y evaluando puntos diferentes en la matriz, todo lo cual se encuentra dentro de las capacidades normales de un facultativo o veterinario formado.

Los métodos y composiciones divulgados en la presente proporcionan proteínas modificadas para su uso en terapia. Por tanto, una dosis parenteral habitual se encuentra en el intervalo de 10~9 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por administración. Las dosis de administración habituales son de aproximadamente 0,0000001 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por administración. La dosis exacta dependerá, por ejemplo, de la indicación, el medicamento, la frecuencia y el modo de administración, el sexo, la edad y el estado físico general del sujeto a tratar, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o afección a tratar, el efecto deseado del tratamiento y otros factores evidentes para el experto en la técnica. Las frecuencias de dosificación habituales son dos veces al día, una vez al día, dos veces al día, dos veces a la semana, una vez a la semana o incluso con intervalos de dosificación más prolongados. Debido a las semividas prolongadas de los compuestos activos en comparación con la proteína no conjugada correspondiente, un régimen de dosificación con intervalos de dosificación prolongados tales como dos

veces a la semana, una vez a la semana o incluso con intervalos de dosificación más prolongados es una realización particular. Muchas enfermedades se tratan utilizando más de un medicamento en el tratamiento, ya sea administrado concomitantemente o administrado secuencialmente. Por lo tanto, se contempla que las proteínas modificadas en los métodos terapéuticos para el tratamiento de una de las enfermedades se puedan utilizar combinadas con uno o más compuestos terapéuticamente activos diferentes utilizados normalmente en el tratamiento de una enfermedad. También se contempla que el uso de la proteína modificada combinada con otros compuestos terapéuticamente activos utilizados normalmente en el tratamiento de una enfermedad en la fabricación de un medicamento para esa enfermedad.

10 Ejemplos

Métodos de preparación generales para modificar compuestos

A menos que se especifique lo contrario, los materiales de partida estaban generalmente disponibles a partir de fuentes comerciales tales como Aldrich Chemicals Co. (Milwaukee, Wis.), Lancaster Synthesis, Inc. (Windham, N.H.), Acros Organics (Fairlawn, N.J.). La transglutaminasa microbiana fue proporcionada por Ajinomoto North America, Inc. (Itasca, IL). CRM₁₉₇ (Número CAS 92092-36-9) está disponible en Aldrich Chemicals Co. (Milwaukee, Wisconsin). La monometilauristatina F se adquirió de Concortis (San Diego, CA). Los reactivos con ciclooctino se adquirieron de Synaffix (Nijmegen, Países Bajos). El polisacárido antigénico MenA fue proporcionado por Novartis NV&D.

Los compuestos modificadores se purificaron mediante cromatografía en columna (Interchim puriflash 430) y se analizaron por espectroscopía RMN (Bruker 400 MHz), LCMS (Waters Acquity UPLC-UV-CAD-MS) y LCUV (Agilent 1200 series UPLC-UV). El CRM₁₉₇ marcado se caracteriza por LCMS (UPLC-UV-TOF-MS HRMS Waters Acquity UPLC Qtof). El CRM₁₉₇ marcado se purifica con filtros amicon (MWCO de 3 kDa o 10 kDa), y/o SEC (purificador ÄKTA de General Electric).

La identificación del sitio de modificación de la proteína (selectividad por un sitio) se caracterizó por mapeo de proteínas. La mTGasa utilizada en los ejemplos es transglutaminasa microbiana de Ajinomoto North America, Inc. (Itasca, IL).

Los siguientes acrónimos utilizados en los ejemplos a continuación tienen los significados correspondientes:

MMAF: monometilauristatina F

mTGasa: transglutaminasa microbiana

MWCO: umbral de peso molecular

NHS: *N*-hidroxisuccinimida

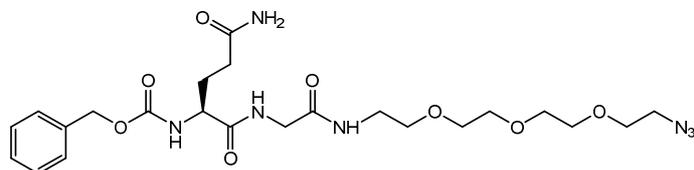
BCN-NHS: *N*-succinimidilcarbonato de (1*R*,8*S*,9*s*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetilo

HATU: Hexafluorofosfato de (*O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio)

TA: temperatura ambiente

Tr: tiempo de retención

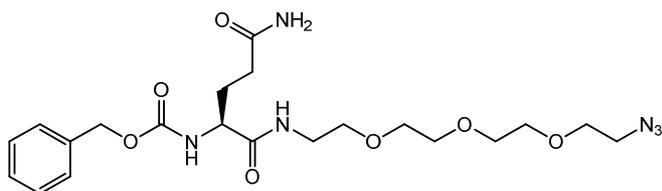
Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (por referencia):



Se añadieron juntos ZQG (1 g, 2,96 mmol), Amino-PEG-Azida (0,882 mL, 4,45 mmol), DIPEA (1,553 mL, 8,89 mmol) y HATU (1,127 g, 2,96 mmol) comercializados en DMF y se agitaron a TA durante 16 h. La solución se cargó directamente sobre una columna C-18 RP de 55 g y se purificó mediante cromatografía en columna con un 5-80% de MeCN/agua. Debido a la gran cantidad de MeOH requerida para cargar la muestra, se observó una forma de pico poco definida. Se redujo el volumen del pico deseado y se volvió a cargar en la columna. El producto se purificó una segunda vez mediante cromatografía en columna con un 5-80% de MeCN/agua. Rendimiento: 300 mg (19% de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,65 - 1,79 (m, 1 H) 1,82 - 1,95 (m, 1 H) 2,07 - 2,17 (m, 2 H) 3,14 - 3,26 (m, 2 H) 3,36 - 3,44 (m, 4 H) 3,46 - 3,56 (m, 8 H) 3,57 - 3,62 (m, 2 H) 3,68 (d, *J*=5,81 Hz, 2 H) 3,91 - 4,04 (m, 1 H) 5,03 (d, *J*=2,27 Hz, 2 H) 6,77 (s, 1 H) 7,23 - 7,34 (m, 2 H) 7,34 - 7,39 (m, 4 H) 7,55 (d, *J*=7,58 Hz, 1 H) 7,82 (t, *J*=5,56 Hz, 1 H) 8,16 (t, *J*=5,68 Hz, 1 H); HRMS calculado (C₂₃H₃₅N₇O₈): 537,2547 observado: (M+1) 538,2623.

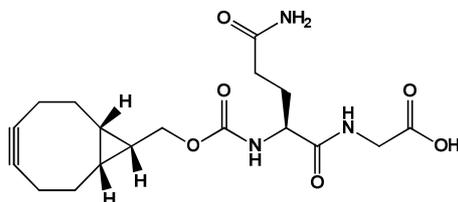
ZQ-NH-(PEG)₃-N₃ (por referencia):



Se combinaron NH₂-(PEG)₃-N₃ (0,087 mL, 0,318 mmol), base de Huenig (0,069 mL, 0,398 mmol) comercializados y ZQ-NHS (100 mg, 0,265 mmol) comercializado en DMSO y se mezclaron a TA 16 h. La reacción se cargó directamente en una columna C-18 de 35 g para una purificación con un 10-75% de MeCN/H₂O. Rendimiento: 90 mg (70% de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,62 - 1,75 (m, 1 H) 1,77 - 1,91 (m, 1 H) 2,08 (dt, *J*=9,14, 5,88 Hz, 2 H) 3,11 - 3,27 (m, 2 H) 3,35 - 3,43 (m, 4 H) 3,48 - 3,56 (m, 8 H) 3,57 - 3,62 (m, 2 H) 3,94 (td, *J*=8,31, 5,38 Hz, 1 H) 5,01 (s, 2 H) 6,73 (s a, 1 H) 7,23 (s a, 1 H) 7,28 - 7,41 (m, 6 H) 7,88 (t, *J*=5,62 Hz, 1 H); HRMS claculado (C₂₁H₃₂N₆O₇): 480,2332 observado: (M+1) 481,2440.

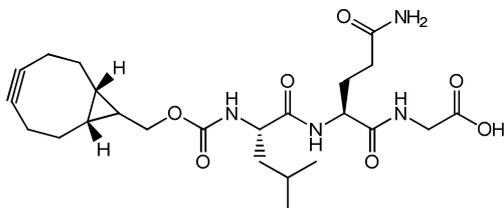
Ciclooctin-ciclopropil-CH₂-OC(O)NH-Q-G



Se disolvieron QG (92 mg, 0,316 mmol) y base de Huenig (64,5 μL, 0,369 mmol) comercializados en 2 mL de agua:DMSO 1:1 y se calentaron hasta 35 °C. Se disolvió éster de *N*-hidroxisuccinimida de BCN I Click-easy™ (50 mg, 0,246 mmol) comercializado en 2 mL de DMSO y se añadió lentamente a la reacción. La reacción se mezcló a 40 °C durante 1 h. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (C-18 de 20 g, 0-70 de MeCN/agua. Producto eluido con alrededor de un 50% de MeCN. Rendimiento: 46 mg (49% de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,87 (t, *J*=9,66 Hz, 2 H) 1,27 (quin, *J*=8,53 Hz, 1 H) 1,52 (d, *J*=10,88 Hz, 2 H) 1,62 - 1,75 (m, 1 H) 1,81 - 1,95 (m, 1 H) 2,04 - 2,25 (m, 8 H) 3,14 (s a, 1 H) 3,49 - 3,73 (m, 2 H) 3,89 - 3,99 (m, 1 H) 4,05 (d, *J*=7,95 Hz, 2 H) 6,72 (s a, 1 H) 7,21 - 7,31 (m, 2 H) 7,88 (s a, 1 H); HRMS calculado (C₁₈H₂₅N₃O₆): 379,1743 observado: (M+1) 380,1811.

Ciclooctin-ciclopropil-CH₂-OC(O)NH-L-Q-G

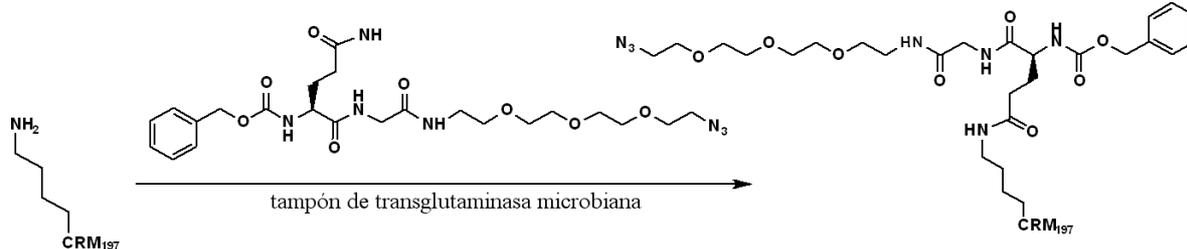


El péptido de leucina-glutamina-glicina se preparó utilizando un sintetizador de péptidos. El sintetizador se programó para la secuencia de leucina-glutamina-glicina. La resina se recuperó y el péptido se eliminó con TFA. La solución se añadió lentamente a éter (frío) y para precipitar el producto. La solución se centrifugó y el éter se decantó. El sólido se disolvió en agua y se purificó mediante cromatografía en columna (columna C-18 RP de 35 g). Producto eluido con un 100% de agua en un 84% de rendimiento.

Se combinaron el péptido de leucina-glutamina-glicina (30 mg, 0,07 mmol), base de Huenig (0,030 mL, 0,174 mmol) y éster de *N*-hidroxisuccinimida BCN I Click-easy™ (20 mg, 0,070 mmol) comercializados en DMF y se agitaron durante cinco horas a temp. ambiente. La reacción se cargó directamente en una columna C-18 de 20 g (0-20% de MeCN/agua) y se purificó sobre 10 CV para proporcionar 20 mg (58% de rendimiento) del producto. HRMS calculado (C₂₁H₃₂N₆O₇): 492,2584 observado: (M+1) 493,2682.

Conjugación de compuestos modificadores a CRM₁₉₇

Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (por referencia)

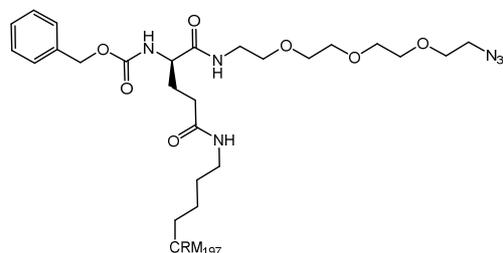


5 Se añaden 32 μ L de CRM197 (32 mg/mL) a 1000 μ L de Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (2 mg/mL) en tampón Tris 100 mM a pH 8 y se añaden 100 μ L de transglutaminasa microbiana (solución madre de 50 mg/mL en PBS 1x preparada a partir de mTGasa al 1% comercial en maltociclodextrina). La reacción se incubó a 25 °C durante 30 minutos. La reacción se purificó mediante SEC con un tampón de análisis de PBS 1x durante 1,5 VC. Se observa una adición del conector en el Espectro de masas. LCMS calculado: 58929; observado: (M+1) 58930. Rendimiento: 700 μ g, 68% de rendimiento.

10 Se añaden 32 μ L de CRM197 (32 mg/mL) a 1000 μ L de Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (2 mg/mL) en tampón Tris 100 mM a pH 8 y se añaden 100 μ L de transglutaminasa microbiana (solución madre de 50 mg/mL en PBS 1x preparada a partir de mTGasa al 1% comercial en maltociclodextrina). La reacción se incubó a 25 °C durante 18 horas. La reacción se purificó mediante SEC con un tampón de análisis de PBS 1x durante 1,5 VC. Se observan dos adiciones del conector en el Espectro de masas. LCMS calculado: 59450; observado: (M+1) 59451. Rendimiento: 700 μ g, 68% de rendimiento.

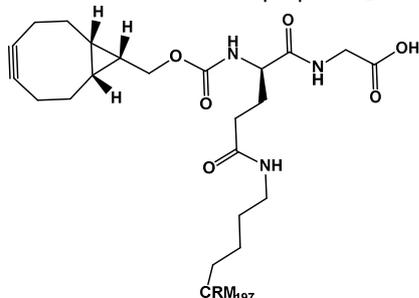
15 Se añaden 32 μ L de CRM197 (32 mg/mL) a 1000 μ L de Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (2 mg/mL) en tampón de acetato de sodio 100 mM a pH 6 y se añaden 100 μ L de transglutaminasa microbiana (solución madre de 50 mg/mL en PBS 1x preparada a partir de mTGasa al 1% comercial en maltodextrina). La reacción se incubó a 25 °C durante 3 días. La reacción se purificó mediante SEC con un tampón de análisis de PBS 1x durante 1,5 VC. Se observan tres y cuatro adiciones en el Espectro de masas. LCMS calculado: 59971, 60492; observado: (M+1) 59972, 60493. Rendimiento: 700 μ g, 68% de rendimiento.

ZQ-NH-(PEG)₃N₃ (por referencia)



25 Se añaden 63 μ L de CRM197 (32 mg/mL) a 1800 μ L de ZQ-NH-(PEG)₃N₃ (2 mg/mL) en tampón Tris 100 mM a pH 8 y se añaden 150 μ L de transglutaminasa microbiana (solución madre de 50 mg/mL en PBS 1x preparada a partir de mTGasa al 1% comercial en maltociclodextrina). La reacción se incubó a 25 °C durante 1 hora. La reacción se purificó mediante SEC con un tampón de análisis de PBS 1x durante 1,5 VC. Se observa una adición del conector en el Espectro de masas. LCMS calculado: 58872; observado: (M+1) 58875. Rendimiento: 1,3 mg (67%).

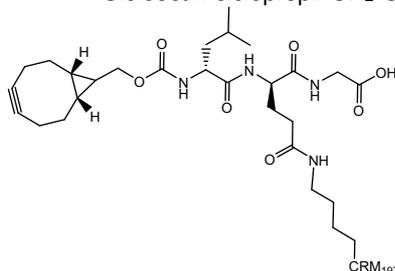
Ciclooctin-ciclopropil-CH₂-OC(O)NH-Q-G



30 Se añaden 32 μ L de CRM197 (32 mg/mL) a 1000 μ L de Ciclooctin-ciclopropil-CH₂-OC(O)NH-Q-G (2 mg/mL) en tampón Tris 100 mM a pH 8 y se añaden 100 μ L de transglutaminasa microbiana (solución madre de 50 mg/mL en PBS 1x preparada a partir de mTGasa al 1% comercial en maltociclodextrina). La reacción se incubó a 25 °C durante 3 horas. La reacción se purificó mediante SEC con un tampón de análisis de PBS 1x durante 1,5 VC

Se observa una adición del conector en el Espectro de masas. LCMS calculado: 58771 observado: (M+1) 58771. Rendimiento: 0,475 mg, 50% de rendimiento.

Ciclooctin-ciclopropil-CH₂-OC(O)NH-L-Q-G

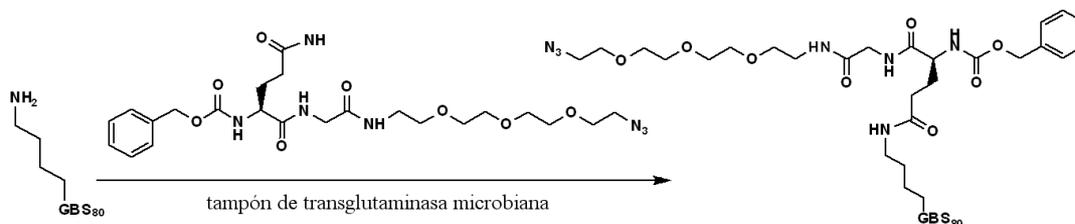


5 Se añade 1 µL de CRM197 (32 mg/mL) a 30 µL de ciclooctin-ciclopropil-CH₂-OC(O)NH-L-Q-G (2 mg/mL) en tampón Tris 100 mM a pH 8 y se añaden 3 µL de transglutaminasa microbiana (solución madre de 50 mg/mL en PBS 1x preparada a partir de mTGasa al 1% comercial en maltociclodextrina). La reacción se incubó a 25 °C durante 1 hora. Se observa una adición del conector en el Espectro de masas. LCMS calculado: 58884 observado: (M+1) 58885.

10 Se añade 1 µL de CRM197 (32 mg/mL) a 30 µL de ciclooctin-ciclopropil-CH₂-OC(O)NH-L-Q-G (2 mg/mL) en tampón Tris 100 mM a pH 8 y se añaden 3 µL de transglutaminasa microbiana (solución madre de 50 mg/mL en PBS 1x preparada a partir de mTGasa al 1% comercial en maltociclodextrina). La reacción se incubó a 25 °C durante 24 horas. Se observan dos adiciones del conector en el Espectro de masas. LCMS calculado: 59360 observado: (M+1) 59361.

Modificación de GBS80 con Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (por referencia)

15



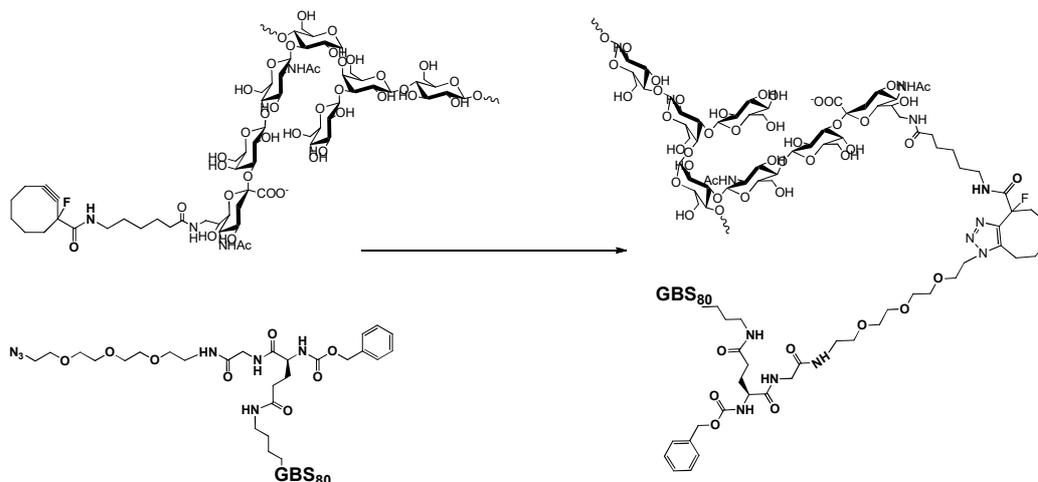
20 Se añadieron 2,32 mL de proteína GBS80 (3,49 mg/mL) a 14 mL de Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (8 mg/mL) en acetato de sodio 100 mM a pH 6 y se añadieron 50 µL de mTGasa (50 mg/mL en PBS). La reacción se incubó durante la noche a 37 °C. El LCMS muestra la adición de 1 y 2 aductos y una pequeña cantidad de +3. La reacción se desactivó con 0,8 mL de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico (10 mg/mL) y se incubó a ta durante 1 h. A continuación, la reacción se hizo pasar a través de una columna zeba spin 3X. El material recuperado se analizó mediante LCMS con lo cual se obtuvo GBS80 modificado en un 78% de rendimiento total. LCMS calculado: 53355, 53880, 54405; observado: (M+1) 53355, 53877, 54398.

25

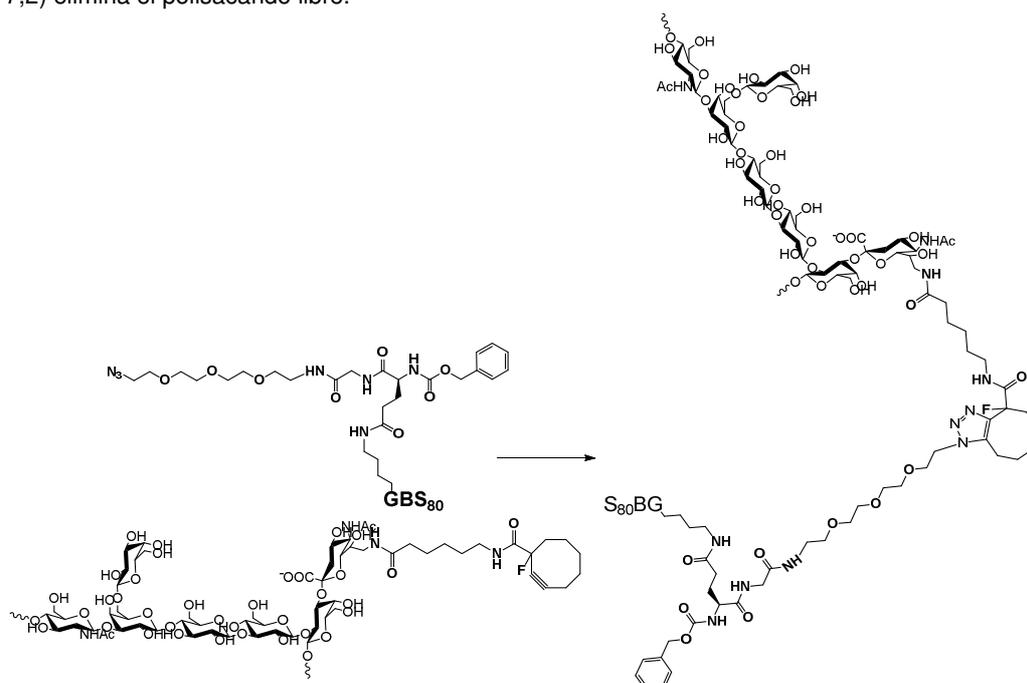
Ejemplos de funcionalización de marcaje de proteínas con lisina selectivo catalizado por mTGasa marcada:

Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (por referencia)

30



5 Se combinaron 3,2 mg de proteína marcada con azida con polisacárido con una proporción de conjugación de PS/Prot 6:1 p/p. Producto purificado por columna HA 2X. El primer experimento (BLOQUE 1 = NaPi 2 mM a pH 7,2, BLOQUE 2 = NaPi 400 mM a pH 7,2) elimina la proteína libre. El segundo experimento (BLOQUE 1 = NaPi 2 mM/NaCl 550 mM a pH 7,2, BLOQUE 2 = NaPi 10 mM a pH 7,2, BLOQUE 3 = NaPi 35 mM a pH 7,2, BLOQUE 4 = NaPi 400 mM a pH 7,2) elimina el polisacárido libre.



10 Se combinaron 3,3 mg de proteína marcada con azida con polisacárido con una proporción de conjugación de PS/Prot 6:1 p/p. Producto purificado por columna HA 2X. El primer experimento (BLOQUE 1 = NaPi 2 mM a pH 7,2, BLOQUE 2 = NaPi 400 mM a pH 7,2) elimina la proteína libre. El segundo experimento (BLOQUE 1 = NaPi 2 mM/NaCl 550 mM a pH 7,2, BLOQUE 2 = NaPi 10 mM a pH 7,2, BLOQUE 3 = NaPi 35 mM a pH 7,2, BLOQUE 4 = NaPi 400 mM a pH 7,2) elimina el polisacárido libre.

15 Tal como se muestra en las Figuras 2-4, se obtuvo la caracterización en gel SDS page de los productos de estos experimentos. Los rendimientos respectivos también se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3.

Muestra	Proteína	Química de conjugación	Sacár./Prot. (p/p)	% de sacarido libre (dionex)	Proteína TOT mg	Sacarido/proteína	Rendimiento
---------	----------	------------------------	--------------------	------------------------------	-----------------	-------------------	-------------

						utilizado para la conjugación (p/p)	(% de proteína final)
GBS PSV(alq.) - GBS80(K-N3)	X	CFCC	4,3	6,7	570,7	6:1	20,6
GBS PSII(alq.) - GBS80(K-N3)	X	CFCC	1,5	< 3,3	1685,7	6:1	24,0

5 Cada uno de estos conjugados de GBS80 sometidos a una reacción click obtenidos mediante el método de marcaje con mTGasa se evaluaron biológicamente ensayos discutidos a continuación.

Inmunoensayo ELISA para la determinación de los valores de Ig frente a antígenos de polisacárido II o V de GBS

10 Los valores de IgG frente a los polisacáridos II o V de GBS en los sueros de animales inmunizados se midieron de la siguiente manera.

15 Las placas de microvaloración (Nunc Maxisorp) se recubrieron con 100 µL de polisacáridos II o V conjugados con HSA-adh (Seroalbúmina humana - dihidrazida del ácido adípico) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con una concentración de 1,0 µg/mL. La placa se incubó durante la noche a temperatura ambiente y a continuación se lavó tres veces en tampón de lavado (0,05% de Tween 20 en PBS). Después de dispensar 250 µL de PBS, BSA al 2%, Tween 20 al 0,05% por pocillo, las placas se incubaron 90 minutos a 37 °C y a continuación se aspiraron para eliminar la solución posterior al recubrimiento. Los sueros de prueba se diluyeron 1:400 en PBS, BSA al 2%, Tween 20 al 0,05%. Se preparó un suero estándar agrupando sueros hiperinmunes y se seleccionaron diluciones iniciales de grupos estándar para obtener una densidad óptica (DO) de aproximadamente 2,000 a 405 nm. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C y a continuación se lavaron con tampón de lavado y se dispensaron 100 µL de IgG antirratón conjugado con fosfatasa alcalina 1:1000 en tampón de dilución en cada pocillo. Las placas se incubaron 90 minutos a 37 °C y a continuación se lavaron con tampón de lavado. Se dispensaron 100 µL de una solución de p-nitrofenilfosfato (p-NPP) con una concentración de 4,0 mg/mL en tampón de sustrato en cada pocillo. Las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se añadieron 100 µL de una solución de sal disódica de EDTA al 7% (p/v) más Na₂HPO₄ al 3,5% a pH 8,0 a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm. Los valores de IgG totales frente a antígenos de polisacáridos (II o V) de GBS se calcularon utilizando el método de ensayo de línea de referencia y los resultados se expresaron como unidades de ELISA arbitrarias/mL (EU/mL). Para cada uno de los tres antígenos, al valor de IgG en suero estándar se le asignó arbitrariamente un valor de 1,0 EU/mL. El valor de IgG de cada suero se estimó interpolando las DO obtenidas con la curva de valoración (inclinación y pendiente) del grupo estándar. Los resultados se presentan en las Figuras 5 y 6.

Modelo de inmunización materna activa en ratones

35 Se inmunizaron grupos de ocho ratones hembra CD-1 (edad, 6-8 semanas) en los días 1, 21 y 35 con 20 µg de antígeno o tampón (PBS) formulado en adyuvante de alum. Posteriormente los ratones se aparearon, y su progenie se estimuló intraperitonealmente con una dosis de GBS calculada para inducir la muerte en un 90% de las crías. Los valores de protección se calcularon como [(% de muertos en el control -% de muertos con la vacuna)/% de muertos en el control] × 100. Los ratones se monitorizaron diariamente y se sacrificaron cuando presentaban puntos finales humanos definidos que habían sido preestablecidos para el estudio de conformidad con las políticas de bienestar animal de Novartis. Se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando la prueba exacta de Fisher. Los resultados se presentan en las Tablas 4 y 5 a continuación.

Tabla 4.

Antígenos	Protegido/Tratado	% de protección
PBS	18/60	30
CRM-II	32/50	64
TT-II	19/30	63
GBS80-II	37/70	53
GBS59-1523-II	59/70	84

Antígenos	Protegido/Tratado	% de protección
GBS80-K-N3/PSII	58/69	84

cepa problema tipo II 5401

Tabla 5.

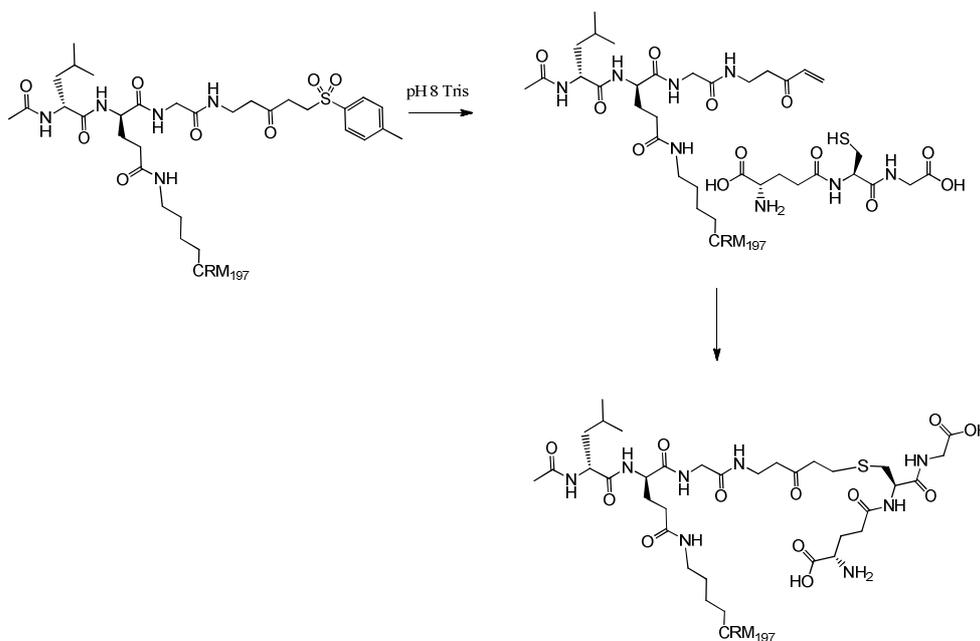
Antígenos	Protegido/Tratado	% de protección
PBS	19/40	47
CRM-V	61/70	87
TT-V	-	-
GBS80-V	54/57	95
GBS59-1523-V	69/79	87
GBS80-K-N3/PSV	53/60	88

cepa problema tipo V CJB111

5 Ensayo de opsonofagocitosis

El ensayo de opsonofagocitosis se llevó a cabo utilizando cepas de GBS como células diana y la línea celular HL-60 (ATCC; CCL-240), se diferenciaron a células de tipo granulocito, añadiendo *N,N*-dimetilformamida (Sigma) 100 mM al medio de crecimiento durante 4 d. Las células bacterianas en la mitad de la fase exponencial se incubaron a 37 °C durante 1 h en presencia de células fagocíticas, un 10% de complemento de gazapo (Cedarlane) y antisero de ratón inactivado por calor. Los controles negativos consistieron en reacciones con sueros preinmunitarios o sin HL-60, o con complemento inactivado por calor. La cantidad de destrucción opsonofagocítica se determinó sustrayendo el log del número de colonias que sobrevivían al ensayo de 1 h del log del número de UFC en el punto temporal cero.

15 Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 7. Los valores de IgG y GBS80-K-N₃/PSII OPKA son comparables estadísticamente con el conjugado GBS80-II preparado mediante conjugación K aleatoria. Los valores de OPKA e IgG muestran una buena correlación con el % de supervivencia en el modelo animal problema.
Ac-L-Q-G-NH-(CH₂)₂-C(O)-(CH₂)₂-SO₂-Tol (por referencia)



20 Se añadió L-glutati6n (5 µL, 0,813 umol) seguido de 50 µL de tamp6n Tris HCl 250 mM a pH 8, lo que elev6 el pH de la reacci6n hasta 8. Despu6s de 4 horas, todo el CRM estaba marcado con un conector como se confirm6 mediante caracterizaci6n por espectrometría de masas. Despu6s de otras 16 horas a 25 °C, todo el CRM estaba marcado con L-glutati6n. Adici6n del L-glutati6n: Masa esperada: 59138, Masa observada: 59139.

25

Resumen experimental del mapeado peptídico:

Digestión del mapeado peptídico: Se redujeron 5 µg de muestras de CRM197 de control positivo y CRM197 modificadas con DTT 20 mM y se digirieron con 1/30 (p/p) enzima/proteína a 26 °C durante la noche con tripsina. Una alícuota de proteína digerida con tripsina se digirió adicionalmente con enzima GluC con una proporción 1/20 de enzima/proteína durante 4 h a 26 °C; cabe destacar que todas las enzimas se adquirieron de Roche Diagnostics (GmbH, Alemania).

Análisis por LC-MS/MS de fase inversa: Los péptidos digeridos resultantes se analizaron por espectrometría de masas tándem por electropulverización con cromatografía líquida (LC-ESI MS/MS) en un Thermo LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) acoplado con Agilent CapLC (Santa Clara, CA). Se cargaron ~10-15 pmol de productos de digestión de control de CRM y CRM197 modificado en una columna a 40 °C (Waters Acuity BEH C18, 1,7 µm, columna 1x100 mm). Se ejecutó un gradiente total de 80 min a 10 µL/min comenzando a 0-1 min, 4% de B, se aumentó hasta un 7% de B a 1,1 min, un 45% de B a 55 min, posteriormente a un 95% de B a 63 min, seguido por un lavado y una equilibración de columna. Los parámetros del espectrómetro de masas incluyeron un evento de análisis completo utilizando el analizador FTMS con una resolución de 30000 de m/z 300-2000 durante 30 ms. Se llevó a cabo una MS/MS de disociación inducida por colisión en los siete iones más intensos (excluyendo los iones 1+) en el analizador de trampa de iones, activado con un umbral de intensidad de señal de 500 recuentos (para todos los eventos) para 30 ms.

Análisis de datos y búsqueda en bases de datos: Todos los espectros de masas se procesaron en Qual Browser V 2.0.7 (Thermo Scientific). Se generaron archivos genéricos de Mascot (mgf) con MS Decon Tools (R. D. Smith Lab, PPNL) y se sometieron a búsqueda utilizando una búsqueda de bases de datos Mascot V2.3.01 (Matrix Science Inc., Boston, MA) frente a la secuencia proteica proporcionada añadida a una base de datos de uso interno y la base de datos SwissProt (V57 con secuencias 513 877) para encontrar proteínas contaminantes. Los parámetros de búsqueda incluían: enzima: semitripsina o tripsina/Glu-C, se permitieron hasta tres escisiones erróneas; modificaciones variables: se añadieron masas esperadas de moléculas de bajo peso molecular (362.147787 Da y 463.206698 Da) a la base de datos denominada "CRM Tgasa +alquino 362Da mod (CKR), CRM Tgasa +alquino 362Da mod (N-term), CRM Tgasa+azida 463Da mod (CKR), CRM Tgasa+azida 463Da mod (N-term)"; tolerancia peptídica: ±20 ppm; MS/MS tolerancia: ±0,6 Da. Las evaluaciones de cobertura de secuencias y modificación de moléculas de bajo peso molecular se llevaron a cabo sobre puntuaciones de iones con >95% de confianza. Se seleccionaron iones peptídicos con puntuaciones elevadas para el análisis de MS/MS manual utilizando Qual Browser.

Resultados para CRM + Ciclooctin-ciclopropil-CH₂-OC(O)NH-Q-G

Digestión con tripsina: Cobertura de secuencia de un 83%; no se detectó modificación a este umbral de puntuación de iones. Digestión con Tripsina/GluC: Cobertura de secuencia de un 97%; se detectó modificación en Lys37 o Lys39.

Digestión con Tripsina/GluC de Exp095 de CRM

Cobertura de secuencia: **91%**, los péptidos apareados se muestran en **Texto en negrita** **K37** o **K39** modificados con CRM Tgasa+azida 463Da mod (CKR)

1 GADDVVDSSKSFVMEFSSYHGKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDDW
 51 KEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVVKVTPGLTKVLALKVDNAE
 101 TIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPAEGSSSVEYI
 151 NNWEQAKALSVELEINFETR^GKRGGDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLS
 201 CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEF
 251 HQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKT
 301 TAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGEL
 351 VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLLHDGYAVSWNT
 401 VEDSIIRTFGQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNSKTHI
 451 SVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVGHANLHVAFHRSSSEKIH
 501 SNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFFEIKS

SEQ ID NO: 1

Resultados para CRM + ZQ-NH-(PEG)₃N₃ (por referencia)

Digestión con tripsina: Cobertura de secuencia de un 69%; no se detectó modificación a este umbral de puntuación de iones. Digestión con Tripsina/GluC: Cobertura de secuencia de un 91%; se detectó modificación en Lys37 o Lys39.

Digestión con Tripsina/GluC de Exp083 de CRM

Cobertura de secuencia: **97%**, los péptidos apareados se muestran en **Texto en negrita** **K37** o **K39** modificados con CRM Tgasa+alquino 362Da mod (CKR)

1 GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDW
51 KEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVYTPGLTKVLALKVDNAE
101 TIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYI
151 NNWEQAKALSVELEINFETR^GK^RG^QD^AM^EY^EM^AQ^AC^AG^NR^VR^RS^VG^SS^LS
201 CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF
251 HQTALEHPELSELKTVGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKT
301 TAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGEL
351 VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNT
401 VEDSIIRTFGQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHI
451 SVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVHANLHVAFHRSSSEKIH
501 SNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEIKS

SEQ ID NO: 2

Control de CRM

- 5 Digestión con tripsina: 85% de cobertura de secuencia.

Digestión con Tripsina/GluC: 79% de cobertura de secuencia.

Procedimiento general para el marcaje mediado por TGasa de CRM197.

- 10 A una solución de conector en tampón tris a pH 8 (3,5 mg/mL, 0,527 μ mol u otra cantidad y concentración micromolar relativa dependiendo del conector identificado anteriormente) se añade CRM197 (33 mg/mL, 7,55 μ L, 0,0043 μ mol) seguido de una solución de enzima transglutaminasa en PBS (50 mg/mL, 7,61 μ L, 0,0100 μ mol). La reacción se agita a ta o 37 °C durante 16 horas.

ES 2 756 526 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Usera, Aimee
 Robinson, Zachary
 Cobb, Jennifer

<120> MODIFICACIONES DE PROTEÍNAS QUIMIOENZIMÁTICAS ESPECÍFICAS PARA UN SITIO

<130> 14293-223

<140> Sin asignar aún
 <141> 2014-07-11

<150> 61/845,273
 <151> 2013-07-11

<150> 62/016,044
 <151> 2014-06-23

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 1
 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser

ES 2 756 526 T3

130
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

ES 2 756 526 T3

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535
 <210> 2
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium diphtheriae
 <400> 2

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60

ES 2 756 526 T3

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255
 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285
 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320

ES 2 756 526 T3

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495

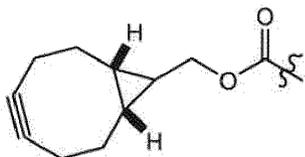
Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535

REIVINDICACIONES

1. Un método para modificar una proteína, que comprende:
 5 proporcionar una proteína diana que tiene al menos un residuo de lisina;
 poner en contacto la proteína diana con un compuesto modificador que tenga la fórmula $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-$
 $(A-W-B-R^2)_z$ en presencia de una transglutaminasa microbiana para formar una proteína modificada;
 donde x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1;
 R^1 es

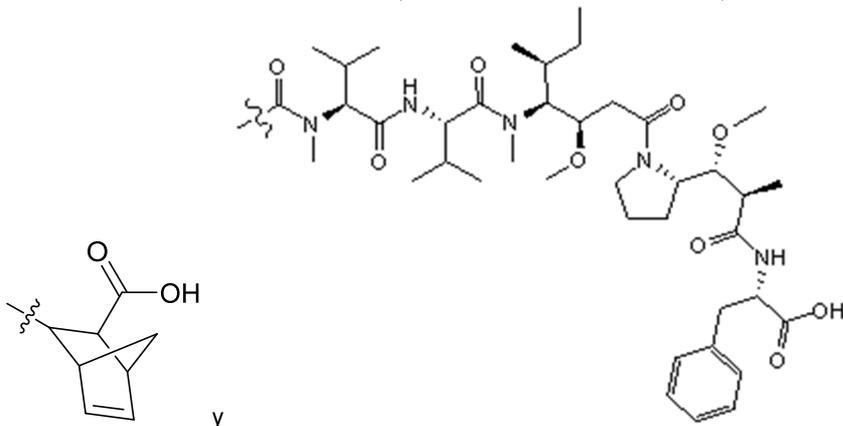
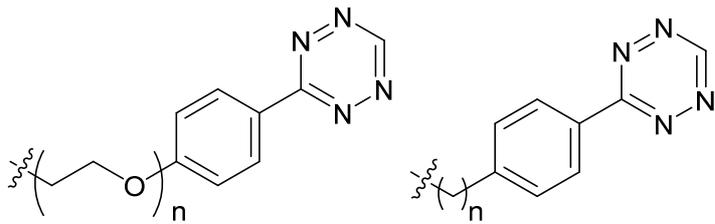
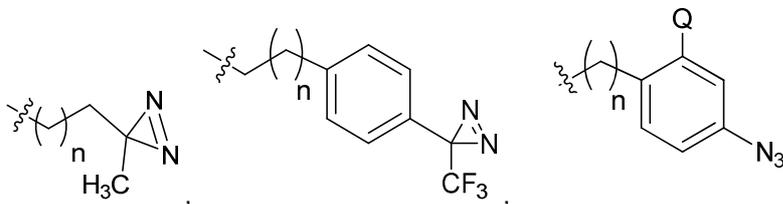
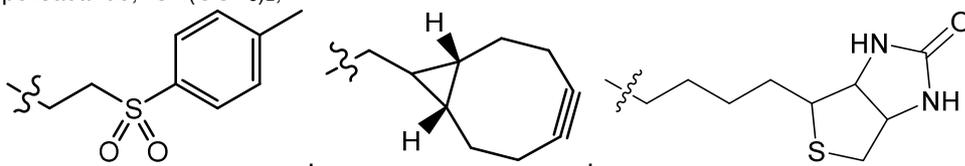


10 W se selecciona entre: alquilo C_{1-6} lineal o ramificado o polietilenglicol que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 000 uma;

A está ausente o se selecciona entre -O-, -NH- y -S-;

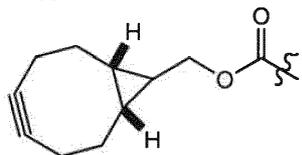
15 B está ausente o se selecciona entre -O-, -C(O)-, -NH-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, -NHC(O)O-, -OC(O)NH-, -OC(O)O-, -C=N(OH)-, -S(O₂)-, -NHS(O₂)-, -S(O₂)NH-, -S(O)-, -NHS(O)-, -S(O)NH-; -C(O)O-, -OC(O)-, -S-, =NH-O-, =NH-NH- y =NH-N(alquilo C_{1-20})-;

R^2 se selecciona del grupo constituido por: un ácido graso, (alquil C_{1-3})-N₃ lineal o ramificado, ciclooctinilo, polisacárido, -CH(OCH₃)₂,



25 cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 6;
 cada Q se selecciona entre H y NO₂.

2. Un compuesto de la fórmula $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ donde x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1; R^1 es

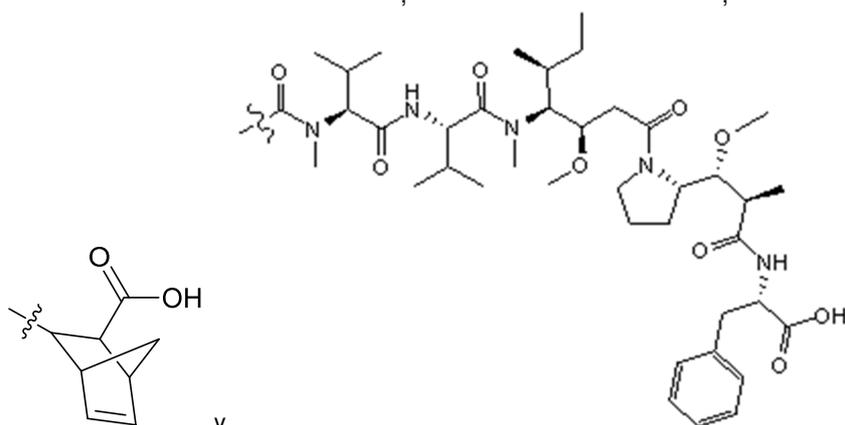
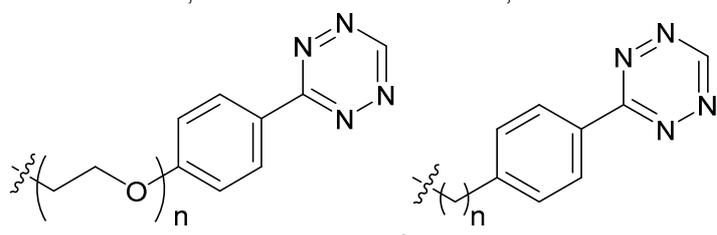
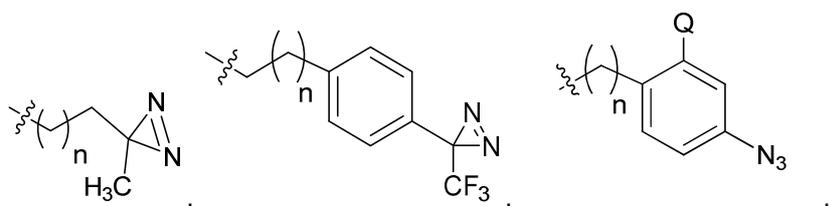
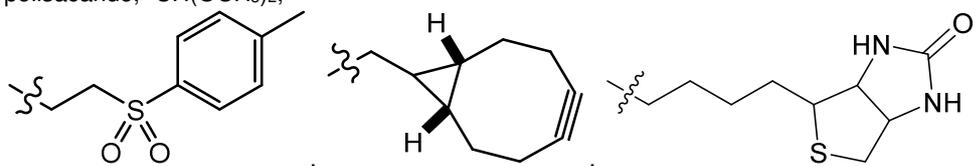


W se selecciona entre: alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado o polietilenglicol que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 000 uma;

A está ausente o se selecciona entre -O-, -NH- y -S-;

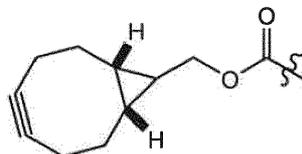
B está ausente o se selecciona entre -O-, -C(O)-, -NH-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, -NHC(O)O-, -OC(O)NH-, -OC(O)O-, -C=N(OH)-, -S(O₂)-, -NHS(O₂)-, -S(O₂)NH-, -S(O)-, -NHS(O)-, -S(O)NH-; -C(O)O-, -OC(O)-, -S-, =NH-O-, =NH-NH- y =NH-N(alquilo C_1-C_{20})-;

10 R^2 se selecciona del grupo constituido por: un ácido graso, (alquil C_1-C_3)-N₃ lineal o ramificado, ciclooctinilo, polisacárido, -CH(OCH₃)₂,



15 cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 6; y cada Q se selecciona entre H y -NO₂.

3. Un compuesto de la fórmula $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ donde x es 0 o 1; y es 0 o 1; z es 0 o 1; R^1 es



W es polietilenglicol lineal que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80.000 uma;

A está ausente o se selecciona entre -O-, -NH- y -S-;

B está ausente o se selecciona entre -O-, -C(O)-, -NH-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, -NHC(O)O-, -OC(O)NH-, -OC(O)O-, -C=N(OH)-, -S(O₂)-, -NHS(O₂)-, -S(O₂)NH-, -S(O)-, -NHS(O)-, -S(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -S-, =NH-O-, =NH-NH- y

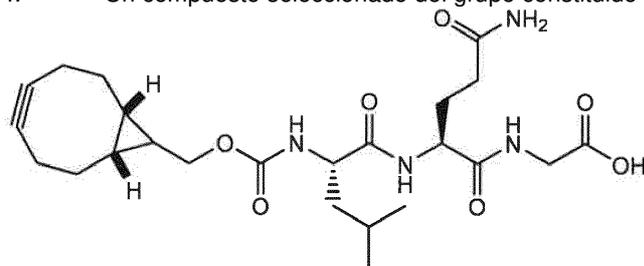
5 =NH-N(alquilo C₁-C₂₀)-;

R² es un fluoróforo;

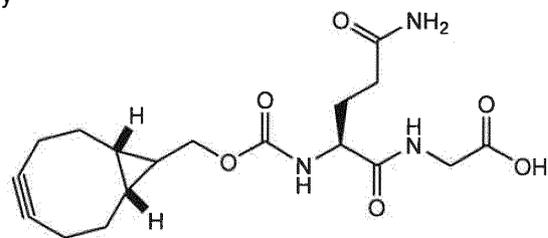
cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 6; y

cada Q se selecciona entre H y -NO₂.

10 4. Un compuesto seleccionado del grupo constituido por:



y



15 5. Un conjugado de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 4, donde el conjugado incluye una proteína conjugada y el compuesto, pudiéndose obtener el conjugado poniendo en contacto la proteína y el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 4 en presencia de una transglutaminasa microbiana.

20 6. El conjugado de la reivindicación 5, donde la proteína conjugada es CRM₁₉₇.

7. El conjugado de la reivindicación 5, donde la proteína conjugada es GBS₈₀.

8. Una vacuna que comprende un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 5-7.

25 9. Una proteína terapéutica que comprende una proteína modificada, donde la proteína modificada es un conjugado de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 4, y el conjugado se puede obtener poniendo en contacto la proteína y el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 4 en presencia de una transglutaminasa microbiana.

30 10. Un agente de imagen que comprende una proteína modificada, donde la proteína modificada es un conjugado de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 4, y el conjugado se puede obtener poniendo en contacto la proteína y el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 4 en presencia de una transglutaminasa microbiana.

35 11. Una herramienta de marcaje que comprende una proteína modificada, donde la proteína modificada es un conjugado de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 4, y el conjugado se puede obtener poniendo en contacto la proteína y el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 4 en presencia de una transglutaminasa microbiana.

40 12. Una proteína modificada obtenida de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en terapia.

FIGURA 1

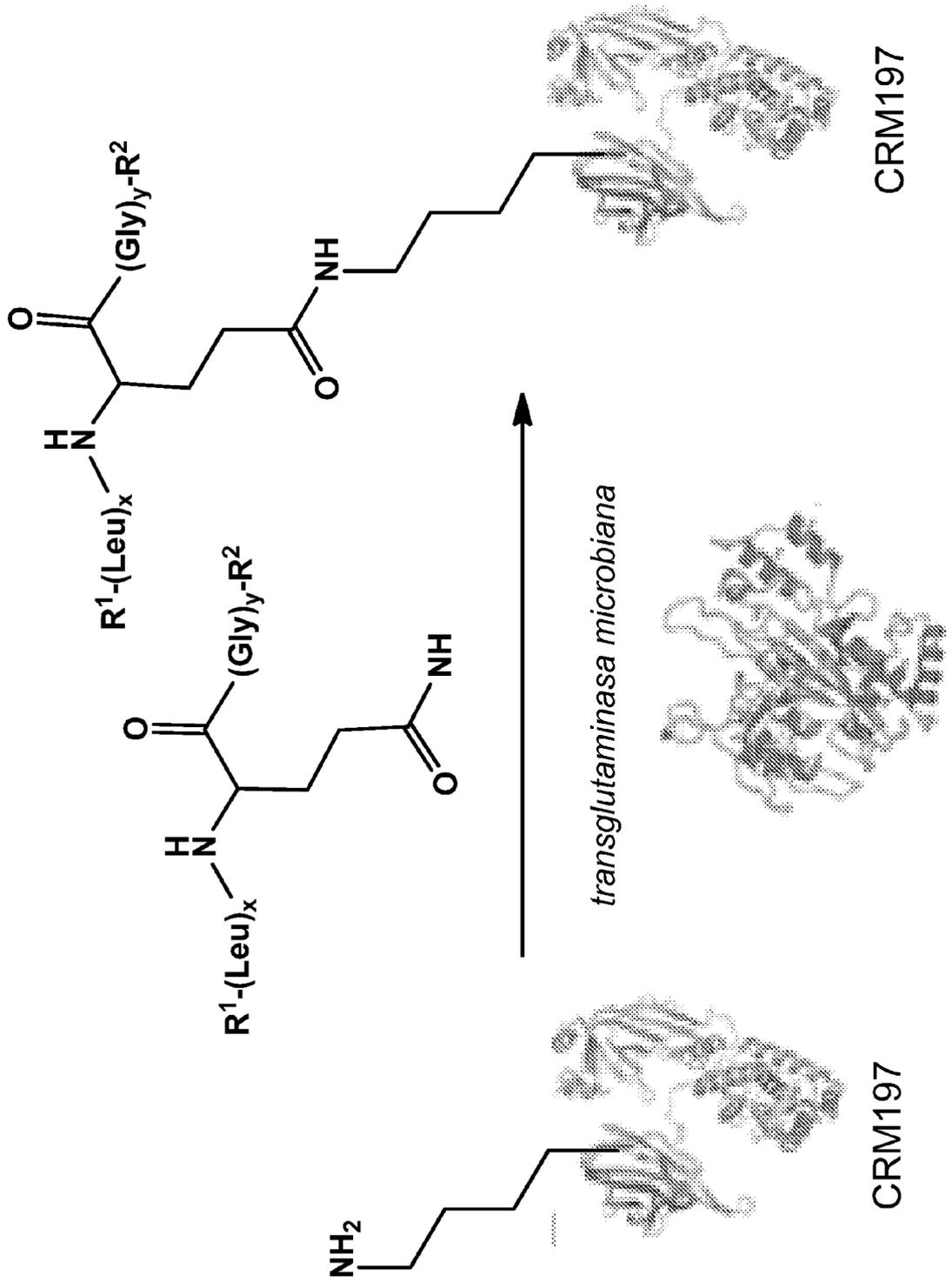


FIGURA 2

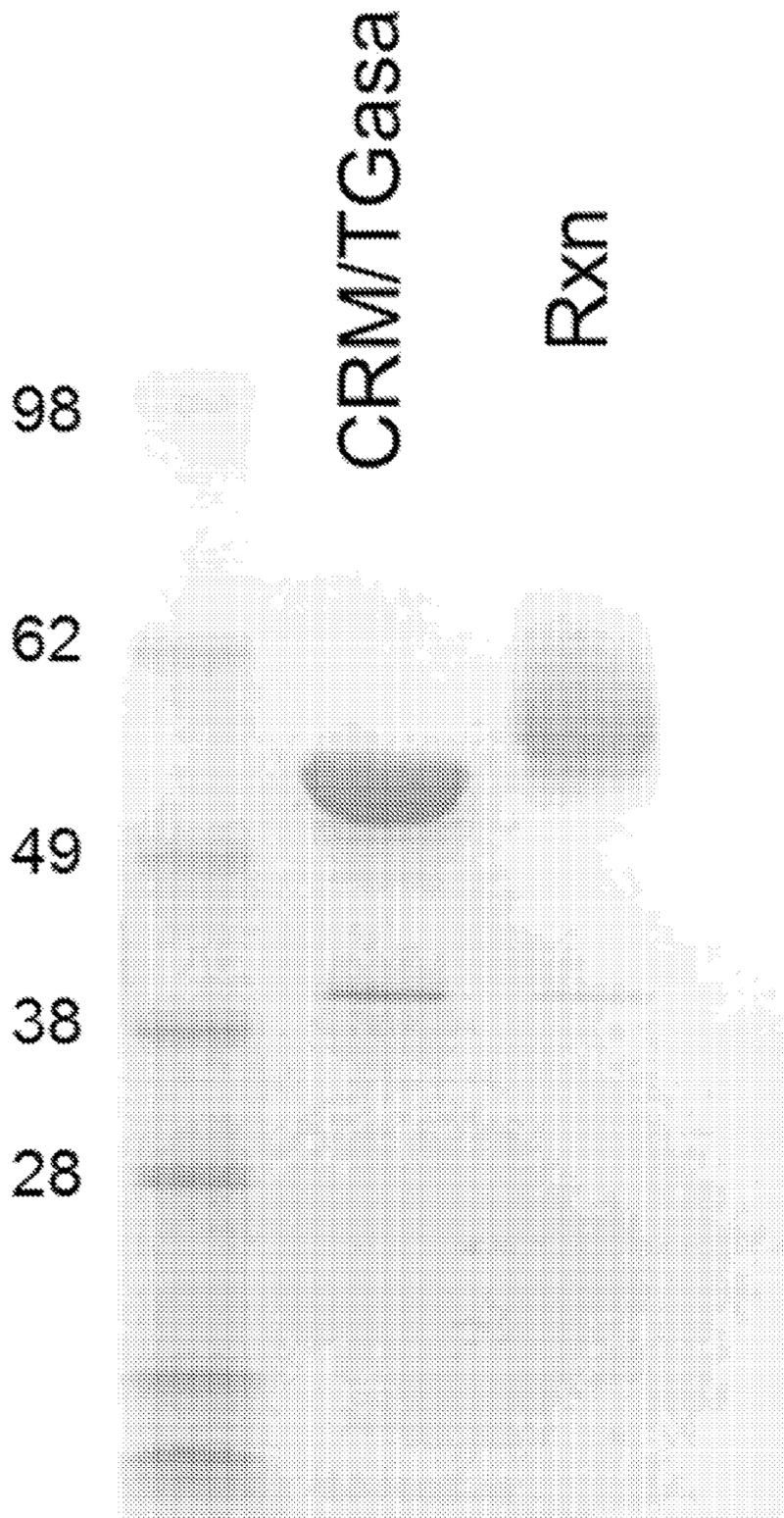


FIGURA 3

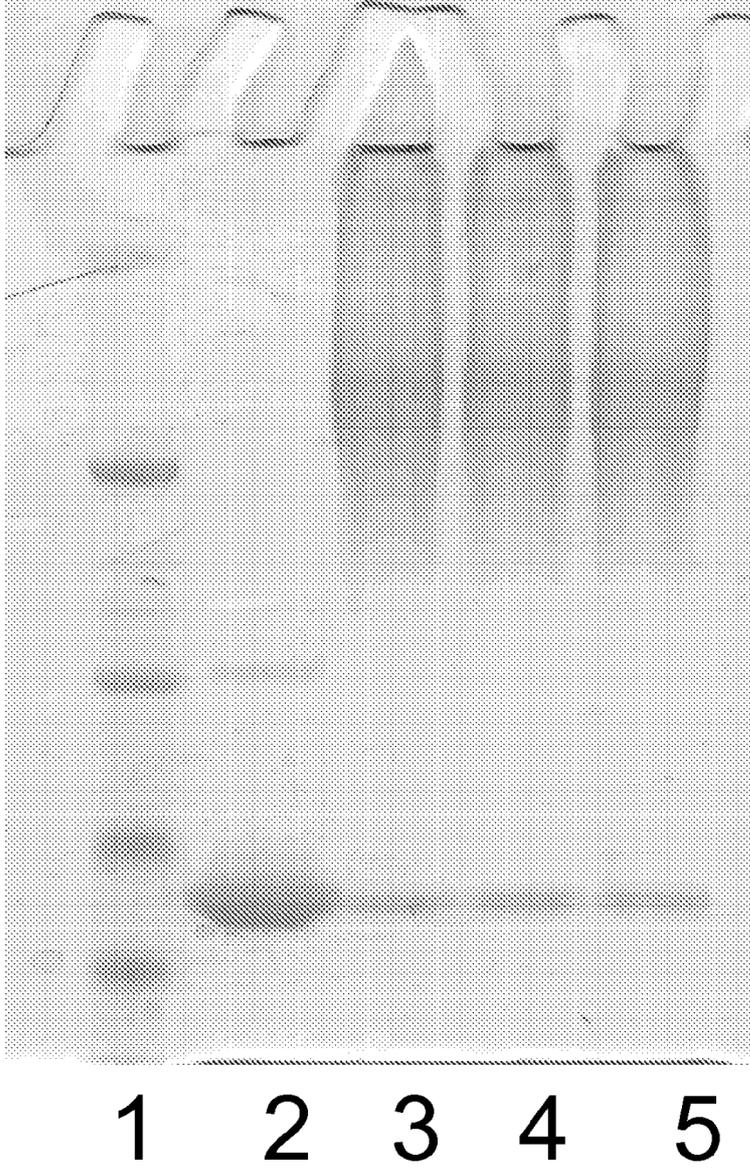
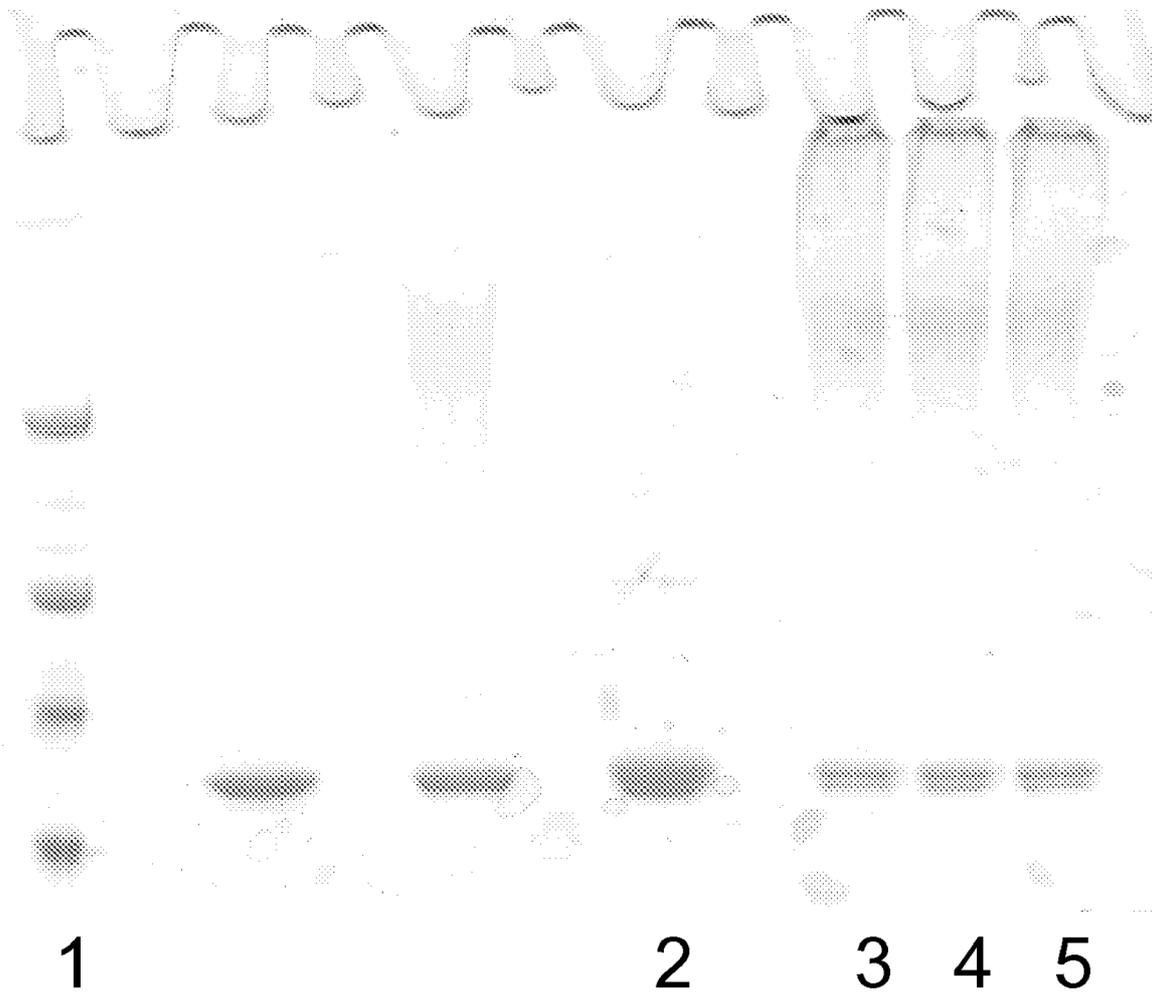


FIGURA 4



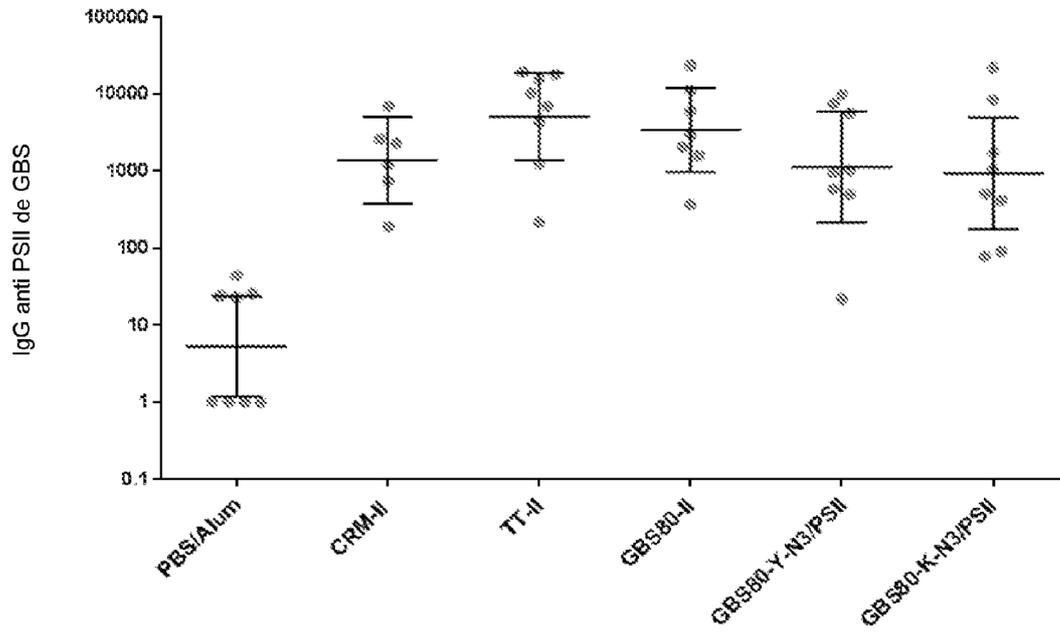


FIGURA 5

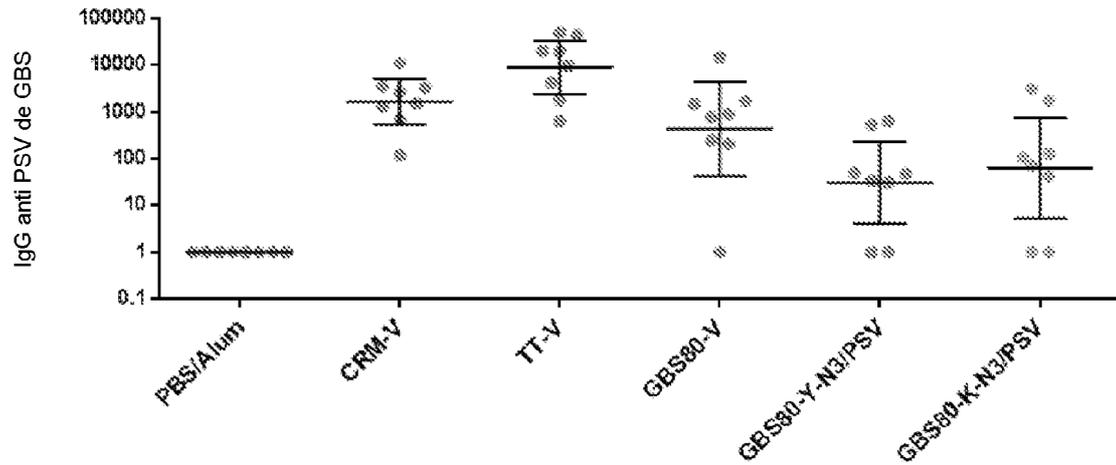


FIGURA 6

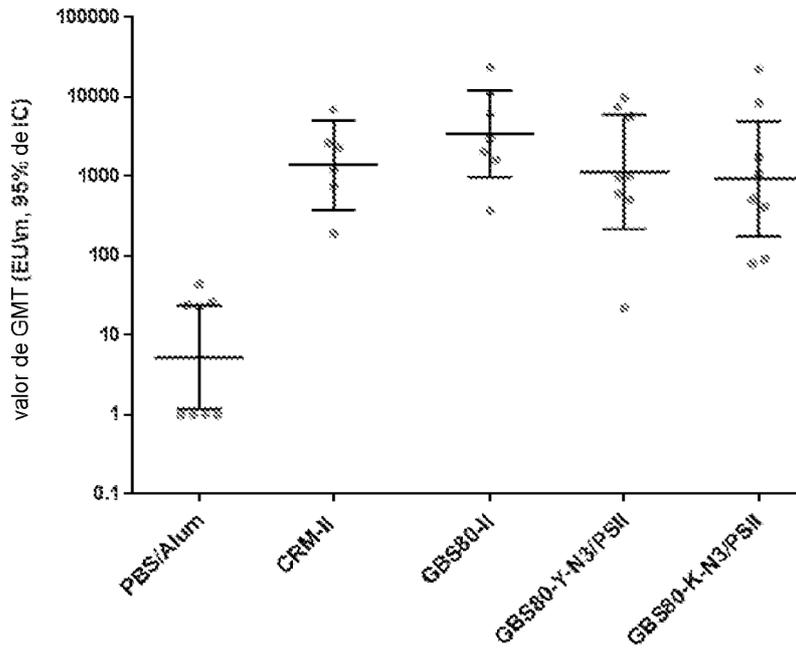


FIGURA 7