



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 774 729**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)  
**C08B 37/00** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2014 PCT/EP2014/050483**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111344**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2014 E 14700602 (7)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2945641**

---

④ Título: **Sacáridos derivativos de cicloalquino**

⑩ Prioridad:

**15.01.2013 GB 201300707**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**22.07.2020**

⑩ Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)**  
Rue de l'Institut, 89  
1330 Rixensart Brussels, BE

⑩ Inventor/es:

**ADAMO, ROBERTO;**  
**BERTI, FRANCESCO y**  
**HU, QI-YING**

⑩ Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 774 729 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Sacáridos derivativos de cicloalquino

**Campo técnico**

5 La presente invención pertenece al campo de los derivativos de sacáridos, conjugados que incluyen sacáridos y procedimientos para producir los derivativos y conjugados de sacárido. Los conjugados son útiles para la inmunización.

**Antecedentes de la invención**

Los sacáridos capsulares de bacterias se han usado durante muchos años en vacunas contra bacterias encapsuladas. Como los sacáridos son antígenos independientes de T, sin embargo, son poco inmunogénicos. La conjugación con un vehículo puede convertir los antígenos independientes de T en antígenos dependientes de T, mejorando así las 10 respuestas de memoria y permitiendo que se desarrolle inmunidad protectora.

15 Mientras que los procedimientos clásicos para la conjugación (aminación reductora, formación de enlaces amida, etc.) se basan en la reacción aleatoria del polisacárido a las aminas de la proteína transportadora, están surgiendo nuevos procedimientos de conjugación que permiten la instalación específica de un ligando en una proteína [1]. La conjugación específica del sitio, además de proporcionar biomoléculas más homogéneas como candidatos de vacunas, podría ayudar a preservar la inmunogenicidad de la proteína.

20 El enfoque de la química clic se ha descrito como un procedimiento para la formación de sustancias complejas uniendo pequeñas subunidades juntas de forma modular [2, 3]. En la técnica se conocen diversas formas de reacción química clic, como la reacción catalizada por cobre de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen [4], que a menudo se denomina "reacción de clic". Otras alternativas incluyen reacciones de cicloadición como la Diels-Alder, reacciones de sustitución nucleofílica (especialmente a pequeños anillos tensos como compuestos epoxi y aziridina), formación de compuestos carbonílicos de compuestos de urea y reacciones que involucran enlaces dobles carbono-carbono, como alquinos en reacciones tiol-ino.

25 La reacción de cicloadición de azida-alquino de Huisgen usa un catalizador de cobre en presencia de un agente reductor para catalizar la reacción de un grupo alquino terminal unido a una primera molécula. En presencia de una segunda molécula que comprende una fracción azida, la azida reacciona con el alquino activado para formar un 1,2,3-triazol 1,4-disustituido. La reacción catalizada por cobre ocurre a temperatura ambiente y es lo suficientemente específica como para que a menudo no se requiera la purificación del producto de reacción [5]. Los grupos funcionales azida y alquino son en gran medida inertes hacia las biomoléculas en medio acuoso, permitiendo que la reacción 30 ocurra en soluciones complejas. El triazol formado es químicamente estable y no está sujeto a la escisión enzimática, lo que hace que el producto de química clic sea altamente estable en los sistemas biológicos. Sin embargo, el catalizador de cobre es tóxico para las células vivas, lo que impide las aplicaciones biológicas.

35 Se ha propuesto una reacción de clic libre de cobre [6], que usa tensión de anillo (en un anillo de ciclooctino) en lugar del catalizador de cobre para promover una reacción de cicloadición de azida-alquino [3 + 2]. La estructura de anillo cerrado induce una deformación sustancial del ángulo de unión del acetileno, que es altamente reactivo con los grupos azida para formar un triazol.

40 Es un objetivo de la presente divulgación proporcionar procedimientos adicionales y mejorados de derivatización de sacáridos. Es otro objeto de la presente divulgación proporcionar procedimientos adicionales y mejorados para conjugar sacáridos con diversas unidades estructurales, tales como proteínas transportadoras. También es un objetivo de la divulgación proporcionar un procedimiento de conjugación que produzca conjugados con estructuras más uniformes. También es un objetivo de la divulgación proporcionar conjugados con propiedades inmunogénicas mejoradas.

**Sumario de la divulgación**

45 Los inventores han desarrollado nuevos procesos para derivatización de sacáridos y para conjugar dichos derivativos de sacárido con otras unidades estructurales. Los inventores también han producido nuevos derivativos y conjugados de sacárido que tienen propiedades mejoradas sobre los derivativos y conjugados de sacárido conocidos en la técnica. En particular, los conjugados de la divulgación pueden tener propiedades inmunológicas mejoradas.

50 En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de derivatización de un sacárido que comprende unir un grupo cicloalquino de ocho miembros al sacárido. La divulgación también proporciona un derivado de sacárido que comprende un grupo cicloalquino de ocho miembros. El derivativo de sacárido que comprende un grupo cicloalquino de ocho miembros puede obtenerse u es obtenible por el procedimiento de derivatización de un sacárido.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para conjugar un derivativo de sacárido con una fracción que contiene azida, que comprende hacer reaccionar el grupo cicloalquino de ocho miembros con la azida para formar un enlace triazol. La divulgación también proporciona un conjugado de un derivativo de sacárido y una fracción que contiene azida, en el que el conjugado tiene la fórmula R-S-T, en la que R comprende un residuo del derivativo de

sacárido, S es un grupo triazol fusionado a un grupo cicloalquilo de ocho miembros y T comprende un residuo de la fracción que contiene azida.

El conjugado puede obtenerse o es obtenible por el procedimiento de conjugar un derivativo de sacárido con una fracción de la divulgación que contiene azida.

5 La presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de la divulgación en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación se refiere además a procedimientos para elevar una respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar un conjugado o composición farmacéutica de la divulgación al mamífero.

#### Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 muestra tres compuestos que contienen ciclooctino.

La Figura 2 muestra un esquema de reacción general para la unión de un grupo ciclooctino a un sacárido de serotipo II de GBS.

La Figura 3 muestra la estructura del sacárido del serotipo V de GBS con el grupo ciclooctino unido (I).

La Figura 4 muestra la estructura del sacárido del serotipo II de GBS con el grupo ciclooctino unido (II).

15 La Figura 5 muestra un esquema de reacción general para la conjugación del derivativo de sacárido (II) a una proteína transportadora GBS80 a través de un residuo de tirosina.

La Figura 6 muestra los resultados de la caracterización de SDS-PAGE para el conjugado A (1=MW, 2=GBS80-Y-N<sub>3</sub>, 3=GBS80-Y-N<sub>3</sub>/PSV después de la purificación).

20 La Figura 7 muestra los resultados de la caracterización de SDS-PAGE para el conjugado B (1=MW, 2=GBS80-Y-N<sub>3</sub>, 3=GBS80-Y-N<sub>3</sub>/PSII después de la purificación).

La Figura 8 muestra los resultados de la caracterización de SDS-PAGE para el conjugado C (1=MW, 2=GBS67-Y-N<sub>3</sub>, 3=GBS67-Y-N<sub>3</sub>/PSII después de la purificación, 4=GBS67-Y-N<sub>3</sub>/PSII después de la purificación).

La Figura 9 muestra los resultados de la caracterización de SDS-PAGE para el conjugado D (1=MW, 2=GBS67-Y-N<sub>3</sub>, 3=GBS67-Y-N<sub>3</sub>/PSII después de la purificación, 4=GBS67-Y-N<sub>3</sub>/PSII después de la purificación).

25 La Figura 10 muestra la estructura del sacárido MenY con el grupo ciclooctino unido (III).

La Figura 11 muestra los resultados de la caracterización de SDS-PAGE para el conjugado E (1=MW, 2=CRM<sub>197</sub>-Y-N<sub>3</sub>, 3=CRM<sub>197</sub>-Y-N<sub>3</sub>/MenY).

La Figura 12 muestra los resultados del inmunoensayo ELISA para la determinación de títulos de IgG contra antígenos de sacárido de serotipo II de GBS (para una dosis de carbohidrato de 1,0 µg).

30 La Figura 13 muestra los resultados del inmunoensayo ELISA para la determinación de títulos de IgG contra antígenos de sacárido de serotipo II de GBS (para una dosis de 0,5 µg de carbohidratos).

La Figura 14 muestra los resultados del inmunoensayo ELISA para la determinación de títulos de IgG contra antígenos de sacárido de serotipo II de GBS (para dosis de proteína de 1,0 µg).

La Figura 15 muestra los resultados del ensayo de opsonofagocitosis utilizando cepas de GBS.

35 La Figura 16 muestra la respuesta inmune de diversos antígenos contra el sacárido del serotipo II de GBS.

La Figura 17 muestra la respuesta inmune de diversos antígenos contra GBS80.

La Figura 18 muestra la estructura de un constructo preparado mediante conjugación selectiva de tirosina de un dímero MenY a CRM197.

#### Descripción detallada de la divulgación

40 La divulgación implica procedimientos de derivatización de un sacárido y procedimientos de conjugación de un derivativo de sacárido a una fracción que contiene azida. La divulgación también implica nuevos derivativos y conjugados de sacáridos. Las características de estos procedimientos, derivativos y conjugados de sacáridos se describen en detalle a continuación.

#### Procedimiento de derivatización de un sacárido

La divulgación se basa en nuevos derivativos de sacárido y procedimientos para producir tales derivativos de sacáridos.

**El sacárido**

5 El sacárido usado en los procedimientos de la divulgación puede ser cualquier sacárido capsular, particularmente un sacárido de un organismo patógeno. Más adelante se describen ejemplos de sacáridos para su uso en los procedimientos de la divulgación. En particular, el sacárido puede ser un sacárido bacteriano, por ejemplo, un sacárido capsular bacteriano.

10 Los sacáridos se pueden usar en forma de oligosacáridos. Éstos se forman convenientemente por fragmentación de polisacárido purificado (por ejemplo, por hidrólisis), la cual normalmente será seguida por la purificación de los fragmentos del tamaño deseado. Los sacáridos pueden purificarse a partir de fuentes naturales. Como alternativa a la purificación, los sacáridos pueden obtenerse por síntesis total o parcial.

*Sacáridos capsulares de S. agalactiae*

15 Los sacáridos capsulares bacterianos preferidos incluyen los de *Streptococcus agalactiae* ("GBS"). El sacárido capsular está unido covalentemente al esqueleto de peptidoglucano del GBS, y es distinto del antígeno del grupo B, que es otro sacárido que está unido al esqueleto de peptidoglucano. El GBS es una causa principal de infecciones

20 bacterianas graves en los primeros 3 meses de vida entre los neonatos y de morbilidad séptica entre las madres [7]. El GBS también es una causa importante de morbilidad y mortalidad entre adultas no embarazadas, particularmente entre las personas mayores y los adultos con afecciones médicas subyacentes. Todas las cepas de GBS poseen un polisacárido capsular (CPS) en su superficie, que es un factor importante de virulencia. Se han caracterizado diez serotipos diferentes de CPS (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX), de los cuales cinco (Ia, Ib, II, III, V) son responsables de la mayoría de las enfermedades neonatales en América del Norte y Europa. Las vacunas conjugadas monovalentes se han preparado contra los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y la eficacia demostrada en modelos animales. Recientemente, se ha demostrado que las proteínas GBS pilus, además de ser estructuras importantes en la adhesión e invasión bacteriana, parecen estar más conservadas que las de otras bacterias Gram-positivas [8].

25 Los sacáridos capsulares de GBS están relacionados químicamente, pero son antigenicamente muy diferentes. Todos los sacáridos capsulares de GBS comparten el siguiente núcleo de trisacárido:



Los diversos serotipos de GBS difieren en la forma en que se modifica este núcleo.

30 La enfermedad relacionada con GBS surge principalmente de los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, con más del 85 % causada por cinco serotipos: Ia, Ib, III y V. La divulgación puede usar un sacárido de cualquier serotipo, en particular los serotipos Ia, Ib, II, III y V.

35 Los sacáridos usados en los procedimientos de la divulgación pueden estar en su forma nativa, o pueden haber sido modificados. Por ejemplo, el sacárido puede ser más corto que el sacárido capsular nativo, o puede modificarse químicamente. En particular, el sacárido capsular del serotipo V usado en la divulgación puede modificarse como se describe en las referencias 9 y 10. Por ejemplo, un sacárido capsular serotipo V que ha sido sustancialmente desialilado. El sacárido capsular de serotipo V de GBS desialilado puede prepararse tratando el sacárido capsular de 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, como se describe en la referencia 9. El sacárido utilizado según la descripción, puede ser un polisacárido capsular sustancialmente de longitud completa, como se encuentra en la naturaleza, o puede ser más corto que la longitud natural. Los polisacáridos de longitud completa se pueden despolimerizar para dar fragmentos más cortos para su uso con la divulgación, por ejemplo, por hidrólisis en ácido suave, por calentamiento, por cromatografía de tamaño, etc. En particular, los sacáridos capsulares de serotipo II y/o III usados en la divulgación pueden despolimerizarse como se describe en las referencias 11 y 12.

45 El sacárido puede modificarse químicamente en relación con el sacárido capsular como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el sacárido puede estar desacetilado en O (parcial o totalmente), desacetilado en N (parcial o totalmente), propionado en N (parcial o totalmente), etc. La desacetilación puede ocurrir antes, durante o después de la conjugación, pero preferiblemente ocurre antes de la conjugación. Dependiendo del sacárido particular, la desacetilación puede o no afectar la inmunogenicidad. La relevancia de la acetilación en O en los sacáridos de GBS en varios serotipos se discute en la referencia 13, y en algunas realizaciones, la acetilación en O de residuos de ácido siálico en las posiciones 7, 8 y/o 9 se retiene antes, durante y después de la conjugación, por ejemplo, por protección/desprotección, por reacetilación, etc. Sin embargo, típicamente el sacárido GBS usado en la presente divulgación no tiene sustancialmente acetilación en O de residuos de ácido siálico en las posiciones 7, 8 y/o 9. En particular, cuando el sacárido GBS se ha purificado mediante extracción de bases como se describe a continuación, luego se pierde típicamente la acetilación en O. El efecto de la desacetilación, etc. puede evaluarse mediante ensayos de rutina.

55 Los sacáridos capsulares se pueden purificar mediante técnicas conocidas, como se describe en 14. Un proceso típico implica extracción de bases, centrifugación, filtración, tratamiento con RNasa/DNasa, tratamiento con proteasa,

concentración, cromatografía de exclusión por tamaño, ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y más ultrafiltración. También es útil el tratamiento de células GBS con la enzima mutanolisina, que corta la pared celular bacteriana para liberar los componentes de la pared celular.

5 Como alternativa, se puede usar el proceso de purificación descrito en la referencia 15. Esto implica la extracción de bases, el tratamiento con etanol/CaCl<sub>2</sub>, la precipitación de CTAB y la solubilización. Un proceso alternativo adicional se describe en la referencia 16.

*Sacáridos capsulares de *N. meningitidis**

10 El sacárido puede ser un sacárido capsular bacteriano. Ejemplos de sacáridos capsulares bacterianos incluyen los de *N. meningitidis*. Con base en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado varios serogrupos de *N. meningitidis*, incluidos A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y y Z. El sacárido en la divulgación puede ser de cualquiera de estos serogrupos. Típicamente, el sacárido es de uno de los siguientes serogrupos meningocócicos: A, C, W135 e Y.

15 Los sacáridos capsulares generalmente se usarán en forma de oligosacáridos. Éstos se forman convenientemente por fragmentación de polisacárido capsular purificado (por ejemplo, por hidrólisis), que generalmente será seguido por la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

20 La fragmentación de polisacáridos se realiza típicamente para dar un grado medio final de polimerización (DP) en el oligosacárido de menos de 30 (por ejemplo, entre 10 y 20, preferiblemente alrededor de 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferiblemente alrededor de 15-20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). El DP puede medirse convenientemente por cromatografía de intercambio iónico o por ensayos colorimétricos [17].

25 Si se realiza la hidrólisis, el hidrolizado generalmente se dimensionará para eliminar los oligosacáridos de longitud corta [18]. Esto se puede lograr de varias maneras, como la ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización de menos de o igual a aproximadamente 6 se eliminan preferiblemente para el serogrupo A, y los de menos de aproximadamente 4 se eliminan preferiblemente para los serogrupos W135 e Y.

30 35 La hidrólisis química de los sacáridos generalmente implica el tratamiento con ácido o base en condiciones que son estándar en la técnica. Las condiciones para la despolimerización de sacáridos capsulares a sus monosacáridos constituyentes son conocidas en la técnica. Un procedimiento de despolimerización implica el uso de peróxido de hidrógeno [19]. Se agrega peróxido de hidrógeno a un sacárido (por ejemplo, para dar una concentración final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 1 %), y luego se incuba la mezcla (por ejemplo, a aproximadamente 55°C) hasta que se haya logrado una reducción deseada de la longitud de la cadena. La reducción en el tiempo puede seguirse retirando muestras de la mezcla y luego midiendo el tamaño molecular (promedio) del sacárido en la muestra. La despolimerización se puede detener mediante enfriamiento rápido una vez que se ha alcanzado la longitud de cadena deseada

*Serogrupos C, W135 e Y*

40 45 Las técnicas para preparar polisacáridos capsulares a partir de meningococos se conocen desde hace muchos años, y típicamente implican un proceso que comprende los pasos de precipitación de polisacáridos (por ejemplo, el uso de un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción con fenol en frío (para eliminar proteínas) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) [por ejemplo véase ref. 20].

50 Un proceso más preferido [21] implica la precipitación de polisacáridos seguido de la solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol inferior. La precipitación se puede lograr usando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro), o sales de bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. El bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB') es particularmente preferido [22]. La solubilización del material precipitado se puede lograr usando un alcohol inferior como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc., pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar complejos de polisacárido CTAB. Se puede agregar etanol al polisacárido precipitado para dar una concentración final de etanol (basada en el contenido total de etanol y agua) de entre 50 % y 95 %.

Después de volver a solubilizar, el polisacárido puede tratarse adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones donde incluso una contaminación menor no es aceptable (por ejemplo, para la producción de vacunas en humanos). Esto generalmente implicará uno o más pasos de filtración, por ejemplo, se puede usar filtración profunda, filtración a través de carbón activado, filtración por tamaño y/o ultrafiltración.

Una vez filtrado para eliminar contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para tratamiento y/o procesamiento adicional. Esto se puede lograr convenientemente mediante el intercambio de cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o sodio).

Se describen procedimientos adicionales y alternativos para la purificación de sacáridos meningocócicos en las referencias 19 y 23.

Como alternativa a la purificación, los sacáridos capsulares de la presente divulgación se pueden obtener mediante síntesis total o parcial, por ejemplo, la síntesis de Hib se describe en la referencia 24, y la síntesis MenA en la referencia 25)

- 5 El sacárido puede modificarse químicamente, por ejemplo, puede ser acetilado en O o desacetilado en O. Cualquiera de tales desacetilación o hiperacetilación puede estar en posiciones específicas en el sacárido. Por ejemplo, la mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en la posición C-7 y/o C-8 de los residuos de ácido siálico, pero alrededor del 15 % de los aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo [26,27]. La acetilación no parece afectar la eficacia protectora (por ejemplo, a diferencia del producto Menjugate™, el producto NeisVac-C™ usa un sacárido desacetilado en O, pero ambas vacunas son efectivas). El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades de disacárido de ácido siálico-galactosa. El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que la unidad de repetición del disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa. Al igual que los sacáridos del serogrupo C, los sacáridos MenW135 y MenY tienen una acetilación en O variable, pero en las posiciones de ácido siálico 7 y 9 [28].

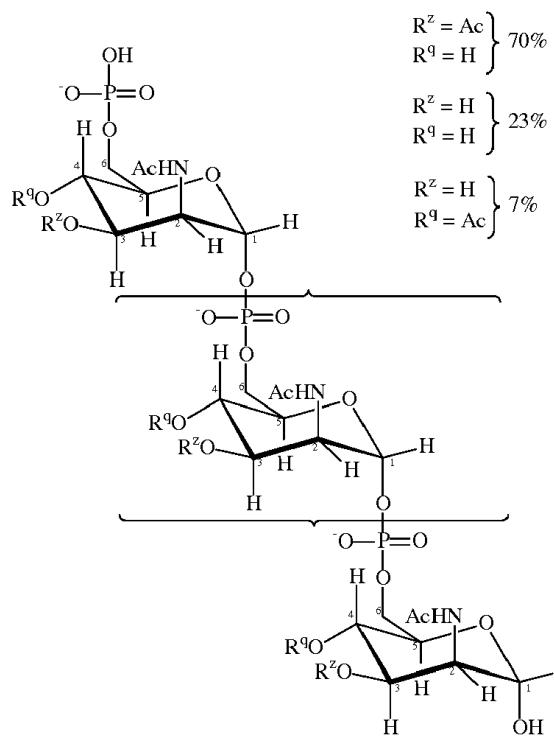
10

### Serogrupo A

- 15 El procedimiento puede incluir un antígeno sacárido capsular del serogrupo A. El sacárido se puede purificar y conjugar de la misma manera que para los serogrupos C, W135 e Y (véase más arriba), aunque es estructuralmente diferente, mientras que las cápsulas de los serogrupos C, W135 e Y se basan en el ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico, NeuAc), la cápsula del serogrupo A se basa en la N-acetil-manosamina, que es el precursor natural del ácido siálico. El sacárido del serogrupo A es particularmente susceptible a la hidrólisis, y su inestabilidad en medios acuosos significa que (a) la immunogenicidad de las vacunas líquidas contra el serogrupo A disminuye con el tiempo, y (b) el control de calidad es más difícil, debido a la liberación de productos de hidrólisis del sacárido en la vacuna.

20

25 El sacárido capsular MenA nativo es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato unido a ( $\alpha$ 1→6), con acetilación en O parcial en C3 y C4. El enlace glucosídico 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 promedio de la cadena es de 93 monómeros. Tiene la siguiente fórmula:



Se ha preparado un antígeno sacárido modificado que retiene la actividad inmunogénica del sacárido 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 monosacáridos se reemplazan por un grupo bloqueador [referencias 29 y 30].

- 30 El número de unidades de monosacáridos que tienen grupos bloqueadores en lugar de hidroxilos puede variar. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las unidades de monosacáridos pueden tener grupos de bloqueo. Alternativamente, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de las unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueadores. 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 monosacáridos pueden tener grupos bloqueadores.

Asimismo, 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.

5 Los grupos de bloqueo para reemplazar los grupos hidroxilo pueden ser accesibles directamente a través de una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir, reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo con otro grupo. Los derivativos adecuados de grupos hidroxilo que actúan como grupos bloqueadores son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo, silyl éteres o alquil éteres) y acetales. Algunos ejemplos específicos de tales grupos de bloqueo son alilo, Aloc, bencilo, BOM, t-butilo, trítilo, TBS, TBDPS, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Otros grupos de bloqueo que no son directamente accesibles y que reemplazan completamente el grupo hidroxilo incluyen alquilo C<sub>1-12</sub>, alquilo C<sub>3-12</sub>, arilo C<sub>5-12</sub>, arilo C<sub>5-12</sub>-alquilo C<sub>1-6</sub>, NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> (R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se definen en el siguiente párrafo), H, F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1-6</sub>), CN, CF<sub>3</sub>, CCl<sub>3</sub>, etc.

10 15 Los grupos de bloqueo típicos tienen la fórmula: -O-X-Y u -OR<sup>3</sup> en la que: X es C(O), S(O) o SO<sub>2</sub>; Y es alquilo C<sub>1-12</sub>, alcoxi C<sub>1-12</sub>, cicloalquilo C<sub>3-12</sub>, arilo C<sub>5-12</sub> o aril C<sub>5-12</sub>-alquilo C<sub>1-6</sub>, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1-6</sub>), CN, CF<sub>3</sub> o CCl<sub>3</sub>; o Y es NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>; R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo C<sub>1-12</sub>, cicloalquilo C<sub>3-12</sub>, arilo C<sub>5-12</sub>, arilo C<sub>5-12</sub>-alquilo C<sub>1-6</sub>; o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden unirse para formar un grupo heterocíclico saturado C<sub>3-12</sub>; R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-12</sub> o cicloalquilo C<sub>3-12</sub>, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1-6</sub>), CN, CF<sub>3</sub> o CCl<sub>3</sub>; o R<sup>3</sup> es arilo C<sub>5-12</sub> o arilo C<sub>5-12</sub>-alquilo C<sub>1-6</sub>, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1-6</sub>), CN, CF<sub>3</sub> o CCl<sub>3</sub>. Cuando R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-12</sub> o cicloalquilo C<sub>3-12</sub>, típicamente está sustituido con 1, 2 o 3 grupos como se definió anteriormente. Cuando R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se unen para formar un grupo heterocíclico saturado C<sub>3-12</sub>, se entiende que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>). El grupo heterocíclico puede contener 1 o 2 heteroátomos (como N, O u S) distintos del átomo de nitrógeno. Ejemplos de grupos heterocíclicos saturados C<sub>3-12</sub> son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidinilo y aziridinilo.

20 25 Los grupos de bloqueo -O-X-Y y -OR<sup>3</sup> pueden prepararse a partir de grupos -OH mediante procedimientos de derivatización estándar, tales como la reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, haluro de alquilo, haluro de sulfonilo, etc. Por lo tanto, el átomo de oxígeno en -O-X-Y es generalmente el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo -X-Y en -O-X-Y generalmente reemplaza el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

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

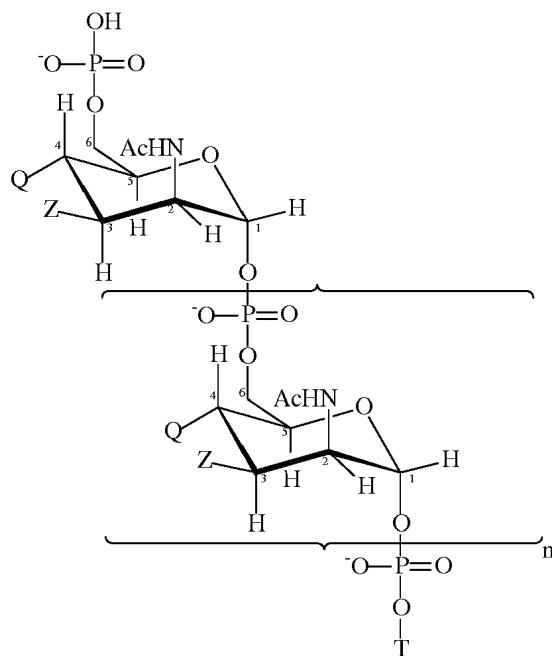
35 40 Los grupos de bloqueo específicos para su uso en la descripción son -OC(O)CF<sub>3</sub> [31] y un grupo carbamato OC(O)NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de alquilo C<sub>1-6</sub>. Típicamente, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos metilo, es decir, el grupo de bloqueo es -OC(O)NMe<sub>2</sub>. Los grupos de bloqueo de carbamato tienen un efecto estabilizador sobre el enlace glucosídico y pueden prepararse en condiciones suaves.

45 50 Un grupo de bloqueo particularmente preferido es -OC(O)CH<sub>3</sub> [30]. La proporción de 4 y/o 3 posiciones en el sacárido del serogrupo A modificado de *Neisseria meningitidis* que tiene este grupo de bloqueo puede variar. Por ejemplo, la proporción de 4 posiciones que tienen grupos de bloqueo puede ser aproximadamente 0 %, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o aproximadamente el 100 %, prefiriéndose al menos el 80 % y aproximadamente el 100 %. Del mismo modo, la proporción de 3 posiciones que tienen grupos de bloqueo puede ser de aproximadamente 0 %, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o aproximadamente 100 %, prefiriéndose al menos 80 % y aproximadamente 100 %. Típicamente, la proporción de 4 y 3 posiciones que tienen grupos de bloqueo es casi la misma en cada posición. En otras palabras, la proporción de 4 posiciones que tienen grupos de bloqueo a 3 posiciones que tienen grupos de bloqueo es de aproximadamente 1:1. Sin embargo, en algunas realizaciones, la proporción de 4 posiciones que tienen grupos de bloqueo puede variar en relación con la proporción de 3 posiciones que tienen grupos de bloqueo. Por ejemplo, la relación de 4 posiciones que tienen grupos de bloqueo a 3 posiciones 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. Del mismo modo, la proporción de 3 posiciones que tienen grupos de bloqueo a 4 posiciones 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.

55 Los sacáridos de MenA modificados típicos contienen n unidades de monosacárido, donde al menos h % de las unidades de monosacárido no tienen grupos -OH en ambas posiciones 3 y 4. El valor de h es 24 o más (por ejemplo, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100) y suele ser 50 o más. Los grupos -OH ausentes son grupos de bloqueo como se definió anteriormente.

Otros sacáridos de MenA modificados típicos comprenden unidades de monosacáridos, en las que al menos s de las unidades de monosacáridos no tienen -OH en la posición 3 y no tienen -OH en la posición 4. El valor de s es al menos 1 (por ejemplo, 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 como se definió anteriormente.

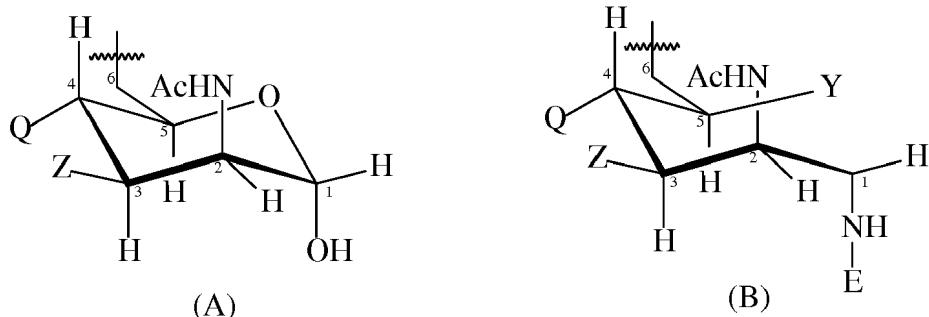
Los sacáridos de MenA modificados adecuados para su uso con la divulgación tienen la fórmula:



en la que

n es un número entero de 1 a 100 (particularmente un número entero de 5 a 25, generalmente 15-25);

5 T es de la fórmula (A) o (B):



cada grupo Z se selecciona independientemente de OH o un grupo de bloqueo como se definió anteriormente; y

cada grupo Q se selecciona independientemente de OH o un grupo de bloqueo como se definió anteriormente;

Y se selecciona de OH o un grupo de bloqueo como se definió anteriormente;

10 E es H o un grupo protector de nitrógeno;

y en el que más de aproximadamente el 7 % (por ejemplo, 8 %, 9 %, 10 % o más) de los grupos Q son grupos bloqueadores. En algunas realizaciones, el grupo hidroxilo unido en el carbono 1 en la fórmula (A) se reemplaza por un grupo de bloqueo como se definió anteriormente. En algunas realizaciones, E en la fórmula (B) es el punto de unión al grupo ciclooctino.

15 Cada uno de los grupos n+2 Z puede ser igual o diferente entre sí. Asimismo, cada uno de los grupos n+2 Q puede ser igual o diferente entre sí. Todos los grupos Z pueden ser OH. Alternativamente, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de los grupos Z pueden ser OAc. Típicamente, aproximadamente el 70 % de los grupos Z son OAc, y la fracción de los grupos Z son OH o grupos de bloqueo como se definió anteriormente. Al menos aproximadamente el 7 % de los grupos Q son grupos de bloqueo. Típicamente, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso el 100 % de los grupos Q son grupos de bloqueo.

Glucanos

El sacárido puede ser un glucano. Los glucanos son polisacáridos que contienen glucosa que se encuentran, entre otras cosas, en las paredes celulares de los hongos. Los  $\alpha$ -glucanos incluyen uno o más enlaces  $\alpha$  entre subunidades de glucosa, mientras que los  $\beta$ -glucanos incluyen uno o más enlaces  $\beta$  entre subunidades de glucosa. El glucano utilizado de acuerdo con la descripción incluye enlaces  $\beta$  y puede contener solo enlaces  $\beta$  (es decir, sin enlaces  $\alpha$ ).

5 El glucano puede comprender uno o más enlaces  $\beta$ -1,3 y/o uno o más enlaces  $\beta$ -1,6. También puede comprender uno o más enlaces  $\beta$ -1,2 y/o enlaces  $\beta$ -1,4, pero normalmente sus únicos enlaces  $\beta$  serán enlaces  $\beta$ -1,3 y/o enlaces  $\beta$ -1,6

El glucano puede ser ramificado o lineal.

10 Los  $\beta$ -glucanos nativos de longitud completa son insolubles y tienen un peso molecular en el rango de megadaltons. Se prefiere usar glucanos solubles en conjugados de la divulgación. La solubilización se puede lograr fragmentando glucanos insolubles largos. Esto se puede lograr por hidrólisis o, más convenientemente, por digestión con una glucanasa (por ejemplo, con una  $\beta$ -1,3-glucanasa o una  $\beta$ -1,6-glucanasa). Como alternativa, los glucanos cortos se pueden preparar sintéticamente uniendo bloques de construcción de monosacáridos.

15 Se prefieren los glucanos de bajo peso molecular, particularmente aquellos con un peso molecular de menos de 100 kDa (por ejemplo, menos de 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 o 15 kDa). También es posible usar oligosacáridos, por ejemplo, con 60 o menos (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) unidades de monosacárido de glucosa. Dentro de este intervalo, se prefieren oligosacáridos con entre 10 y 50 o entre 20 y 40 unidades de monosacáridos.

20 25 El glucano puede ser un glucano fúngico. Un 'glucano fúngico' generalmente se obtendrá de un hongo pero, cuando se encuentra una estructura particular de glucano en hongos y no hongos (por ejemplo, en bacterias, plantas inferiores o algas), entonces el organismo no fúngico puede usarse como fuente alternativa. Por lo tanto, el glucano puede derivarse de la pared celular de una *Candida*, como *C. albicans*, o de *Coccidioides immitis*, *Trichophyton verrucosum*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis* o *Pythium insidiosum*.

30 35 Existen diversas fuentes de  $\beta$ -glucanos fúngicos. Por ejemplo, los  $\beta$ -glucanos puros están disponibles comercialmente, por ejemplo, pustulano (Calbiochem) es un  $\beta$ -1,6-glucano purificado de *Umbilicaria papullosa*. Los  $\beta$ -glucanos se pueden purificar de las paredes celulares fúngicas de varias maneras. La referencia 32, por ejemplo, divulga un procedimiento de dos pasos para preparar un extracto de  $\beta$ -glucano soluble en agua de *Candida*, libre de manano de la pared celular, que implica la oxidación de NaClO y la extracción de DMSO. El producto resultante (' $\beta$ -D-glucano soluble de *Candida*' o 'CSBG') se compone principalmente de un  $\beta$ -1,3-glucano lineal con una fracción lineal de  $\beta$ -1,6-glucano. De manera similar, la referencia 33 describe la producción de GG-zym a partir de *C. albicans*. Dichos glucanos de *C. albicans* incluyen (a)  $\beta$ -1,6-glucanos con cadenas laterales de  $\beta$ -1,3-glucano y un grado promedio de polimerización de aproximadamente 30, y (b)  $\beta$ -1,3-glucanos con cadenas laterales de  $\beta$ -1,6-glucano y un grado medio de polimerización de aproximadamente 4.

40 45 En algunas realizaciones de la divulgación, el glucano es un glucano  $\beta$ -1,3 con alguna ramificación  $\beta$ -1,6, como se ve en por ejemplo, laminarinas. Las laminarinas se encuentran en algas pardas y algas marinadas. Las relaciones  $\beta$ (1-3): $\beta$ (1-6) de laminarinas varían entre diferentes fuentes, por ejemplo, es tan bajo como 3:2 en laminarina de *Eisenia bicyclis*, pero tan alto como 7:1 en laminarina de *Laminaria digititata* [34]. Por lo tanto, el glucano utilizado con la descripción puede tener una relación  $\beta$ (1-3): $\beta$ (1-6) de entre 1,5:1 y 7,5:1, por ejemplo, aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 o 7:1. Opcionalmente, el glucano puede tener una subunidad de manitol terminal, por ejemplo, un residuo de manitol unido a 1,1- $\alpha$  [35]. El glucano también puede comprender subunidades de manosa.

50 55 En otras realizaciones, el glucano tiene exclusiva o principalmente enlaces  $\beta$ -1,3, como se ve en el curdlano. Estos glucanos pueden obtener una mejor protección que los glucanos que comprenden otros enlaces, particularmente los glucanos que comprenden enlaces  $\beta$ -1,3 y una mayor proporción de enlaces  $\beta$ -1,6. Por lo tanto, el glucano puede estar compuesto únicamente por residuos de glucosa unidos a  $\beta$ -1,3 (por ejemplo,  $\beta$ -D-glucopiranosas lineales con enlaces exclusivamente 1,3). Sin embargo, opcionalmente, el glucano puede incluir residuos de monosacáridos que no son residuos de glucosa unidos a  $\beta$ -1,3, por ejemplo, puede incluir residuos de glucosa unidos a  $\beta$ -1,6. La proporción de residuos de glucosa unidos a  $\beta$ -1,3 a estos otros residuos debe ser de al menos 8:1 (por ejemplo,  $\geq$ 9:1,  $\geq$ 10:1,  $\geq$ 11:1,  $\geq$ 12:1,  $\geq$ 13:1,  $\geq$ 14:1,  $\geq$ 15:1,  $\geq$ 16:1,  $\geq$ 17:1,  $\geq$ 18:1,  $\geq$ 19:1,  $\geq$ 20:1,  $\geq$ 25:1,  $\geq$ 30:1,  $\geq$ 35:1,  $\geq$ 40:1,  $\geq$ 45:1,  $\geq$ 50:1,  $\geq$ 75:1,  $\geq$ 100:1, etc.) y/o hay uno o más (por ejemplo,  $\geq$ 1,  $\geq$ 2,  $\geq$ 3,  $\geq$ 4,  $\geq$ 5,  $\geq$ 6,  $\geq$ 7,  $\geq$ 8,  $\geq$ 9,  $\geq$ 10,  $\geq$ 11,  $\geq$ 12, etc.) secuencias de al menos cinco (por ejemplo,  $\geq$ 5,  $\geq$ 6,  $\geq$ 7,  $\geq$ 8,  $\geq$ 9,  $\geq$ 10,  $\geq$ 11,  $\geq$ 12,  $\geq$ 13,  $\geq$ 14,  $\geq$ 15,  $\geq$ 16,  $\geq$ 17,  $\geq$ 18,  $\geq$ 19,  $\geq$ 20,  $\geq$ 30,  $\geq$ 40,  $\geq$ 50,  $\geq$ 60, etc.) residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos solo por enlaces  $\beta$ -1,3. Por "no terminal" se entiende que el residuo no está presente en un extremo libre del glucano. En algunas realizaciones, los residuos no terminales adyacentes pueden no incluir ningún residuo al que esté unido el grupo ciclooctino. La presencia de cinco residuos no terminales adyacentes unidos a otros residuos solo por enlaces  $\beta$ -1,3 puede proporcionar una respuesta de anticuerpos protectores, por ejemplo, contra *C. albicans*.

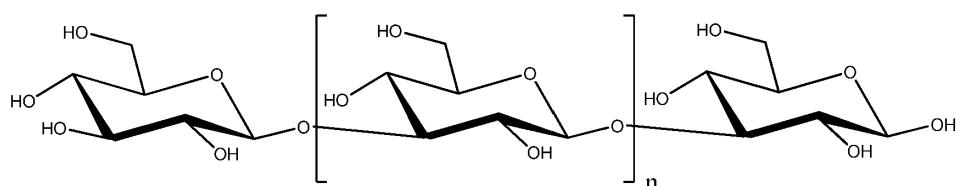
En realizaciones adicionales, un conjugado puede incluir dos glucanos diferentes, por ejemplo, un primer glucano que tiene una relación  $\beta(1-3):\beta(1-6)$  de entre 1,5:1 y 7,5:1, y un segundo glucano que tiene enlaces exclusiva o principalmente de  $\beta$ -1,3. Por ejemplo, un conjugado puede incluir tanto un glucano de laminarina como un glucano de curdlano.

- 5 Cuando un  $\beta$ -glucano incluye enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 en una relación y/o secuencia deseada, entonces este glucano puede encontrarse en la naturaleza (por ejemplo, una laminarina), o puede hacerse artificialmente. Por ejemplo, puede hacerse por síntesis química, total o parcialmente. Se conocen procedimientos para la síntesis química de glucanos  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6, por ejemplo, de las referencias 36-46. El  $\beta$ -glucano que incluye enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 en una proporción deseada también se puede hacer a partir de un glucano disponible y tratarlo con una  $\beta$ -1,6-glucanasa (también conocida como glucano endo-1,6- $\beta$ -glucosidasa, 1,6- $\beta$ -D-glucano glucanohidrolasa, etc.; EC 3.2.1.75) o una  $\beta$ -1,3-glucanasa (como una exo-1,3-glucanasa (EC 3.2.1.58) o una endo-1,3-glucanasa (EC 3.2.1.39) hasta alcanzar una relación y/o secuencia deseada.

10 Cuando se desea un glucano que contenga únicamente glucosa unida a  $\beta$ -1,3, entonces el tratamiento con  $\beta$ -1,6-glucanasa puede realizarse hasta su finalización, ya que la  $\beta$ -1,6-glucanasa producirá finalmente  $\beta$ -1,3 puro glucano. Sin embargo, más convenientemente, se puede usar un  $\beta$ -1,3-glucano puro. Estos pueden hacerse sintéticamente, por síntesis química y/o enzimática, por ejemplo, utilizando una (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucano sintasa, de los cuales se conocen varios de muchos organismos (incluidas bacterias, levaduras, plantas y hongos). Se conocen procedimientos para la síntesis química de glucanos  $\beta$ -1,3, por ejemplo, por las referencias 47-50. Como alternativa útil a la síntesis, se puede usar un  $\beta$ -1,3-glucano natural, como un curdlano ( $\beta$ -1,3-glucano lineal de un *Agrobacterium* previamente conocido como *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*; disponible comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich catálogo C7821) o paramilon ( $\beta$ -1,3-glucano de *Euglena*). Los organismos que producen altos niveles de  $\beta$ -1,3-glucanos son conocidos en la técnica, por ejemplo, *Agrobacterium* de las referencias 51 y 52, o la *Euglena gracilis* de la referencia 53.

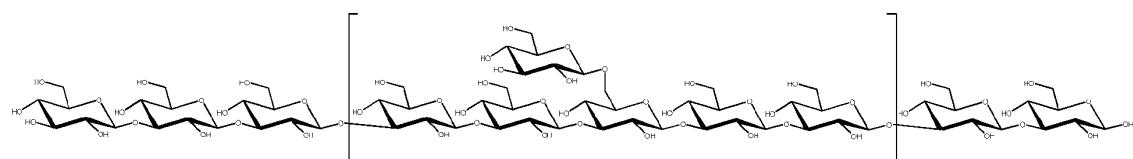
15 La laminarina y el curdlano se encuentran típicamente en la naturaleza como polímeros de alto peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular de al menos 100 kDa. A menudo son insolubles en medios acuosos. En sus formas naturales, por lo tanto, no se adaptan bien a la inmunización. Por lo tanto, la divulgación puede usar un glucano más corto, por ejemplo, los que contienen 60 o menos unidades de glucosa monosacárido (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 usar un glucano que tenga varios 20 residuos de glucosa en el rango de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 20-40 unidades de glucosa. Un glucano con 25-30 residuos de glucosa es particularmente útil. Se pueden formar glucanos adecuados, por ejemplo, por hidrólisis ácida de un glucano natural, o por digestión enzimática, por ejemplo, con una glucanasa, como una  $\beta$ -1,3-glucanasa. 25 Un glucano con 11-19, por ejemplo, 13-19 y particularmente 15 o 17, las unidades de monosacárido de glucosa también son útiles. En particular, los glucanos con las siguientes estructuras (A) o (B) se prevén específicamente para 30 su uso en la presente divulgación:

35 (A)



en la que  $n+2$  está en el rango de 2-60, por ejemplo, entre 10-50 o entre 2-40. Preferiblemente,  $n+2$  está en el rango de 25-30 o 6-19, por ejemplo, 6 o 13-17. Los inventores han descubierto que  $n+2 = 6$  es adecuado,  $n+2 = 15$  también puede ser adecuado

(B)



40 en la que  $n$  está en el rango de 0-9, por ejemplo, entre 1-7 o entre 2-6. Preferiblemente,  $n$  está en el rango de 3-4 o 1-3. Los inventores han encontrado que  $n = 2$  es adecuado.

45 En algunas realizaciones, el glucano es una especie molecular única. En estas realizaciones, todas las moléculas de glucano son idénticas en términos de secuencia. En consecuencia, todas las moléculas de glucano son idénticas en términos de sus propiedades estructurales, incluido el peso molecular, etc. Por lo general, esta forma de glucano se

obtiene por síntesis química, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Por ejemplo, la referencia 48 describe la síntesis de una sola especie unida a  $\beta$ -1,3. Alternativamente, en otras realizaciones, el glucano se puede obtener de un glucano natural, por ejemplo, un glucano de *L. digitata*, *Agrobacterium* o *Euglena* como se describió anteriormente, purificándose el glucano hasta obtener las especies moleculares individuales requeridas. Los glucanos naturales que se han purificado de esta manera están disponibles comercialmente. Un glucano que es una especie molecular única puede identificarse midiendo la polidispersidad (Mw/Mn) de la muestra de glucano. Este parámetro puede medirse convenientemente mediante SEC-MALLS, por ejemplo, como se describe en la referencia 54. Los glucanos adecuados para su uso en esta realización de la divulgación tienen una polidispersidad de aproximadamente 1, por ejemplo, 1,01 o menos.

10 La solubilidad de los glucanos naturales, como el curdlano, se puede aumentar mediante la introducción de grupos iónicos (por ejemplo, por sulfatación, particularmente en O-6 en el curdlano). Dichas modificaciones pueden usarse con la divulgación, pero se evitan idealmente ya que pueden alterar la antigenicidad del glucano.

Cuando el sacárido es un glucano, típicamente es una laminarina.

**Sacáridos capsulares de *S. pneumoniae***

15 Como se discutió anteriormente, el sacárido también puede ser un sacárido capsular bacteriano. Otros ejemplos de sacáridos capsulares bacterianos incluyen los de *S. pneumoniae*. Cuando el sacárido es un sacárido capsular de *S. pneumoniae*, generalmente proviene de uno de los siguientes serotipos neumocócicos: 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, preferiblemente de 1, 5, 6B, 14, 19F y 23F. Los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* comprenden unidades repetidas de oligosacáridos que pueden contener hasta 8 residuos de azúcar. Las unidades de oligosacáridos para los principales serotipos de *S. pneumoniae* se describen en las referencias 55 y 56.

20 **Sacáridos capsulares de *S. aureus***

Sacáridos capsulares bacterianos de ejemplo adicionales incluyen los de *S. aureus*, particularmente los polisacáridos capsulares de *S. aureus* tipo 5 y tipo 8. Las estructuras de los polisacáridos capsulares tipo 5 y tipo 8 se describieron en las referencias 57 y 58 como:

25 **Tipo 5**

→ 4)- $\beta$ -D-ManNAcA(3OAc)-(1→4)- $\alpha$ -L-FucNAc(1→3)- $\beta$ -D-FucNAc-(1→Tipo 8  
→ 3)- $\beta$ -D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)- $\alpha$ -L-FucNAc(1→3)- $\beta$ -D-FucNAc-(1→

Datos recientes de espectroscopía de RMN [59] han llevado a una revisión de estas estructuras para:

30 **Tipo 5**  
→ 4)- $\beta$ -D-ManNAcA-(1→4)- $\alpha$ -L-FucNAc(30Ac)-(1→3)- $\beta$ -D-FucNAc-(1→

**Tipo 8**

→ 3)- $\beta$ -D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)- $\alpha$ -L-FucNAc(1→3)- $\alpha$ -D-FucNAc(1→

35 El polisacárido puede modificarse químicamente en relación con el polisacárido capsular como se encuentra en la naturaleza.

40 Por ejemplo, el polisacárido puede ser desacetilado en O (parcial o totalmente), desacetilado en N (parcial o totalmente), propionado en N (parcial o totalmente), etc. La desacetilación puede ocurrir antes, durante o después de la conjugación, pero generalmente ocurre antes de la conjugación. El efecto de la desacetilación, etc. puede evaluarse mediante ensayos de rutina. Por ejemplo, la relevancia de la acetilación en O en *S. aureus* tipo 5 o tipo 8 polisacáridos capsulares se discute en la referencia 60. Se dice que los polisacáridos nativos en este documento tienen 75 % de acetilación en O. Estos polisacáridos indujeron anticuerpos contra la cadena principal del polisacárido y los grupos O-acetilo. Los polisacáridos con 0 % de acetilación en O todavía provocaban anticuerpos contra la cadena principal de polisacáridos. Ambos tipos de anticuerpos eran opsónicos contra las cepas de *S. aureus* que variaban en su contenido de O-acetilo. Por consiguiente, los polisacáridos capsulares tipo 5 o tipo 8 usados en la presente divulgación pueden tener entre 0 y 100 % de acetilación en O.

45 El grado de acetilación en O del polisacárido se puede determinar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por RMN de protones (por ejemplo, como se describe en las referencias 61, 62, 63 o 64). Se describe un procedimiento adicional en la referencia 65. Se pueden usar procedimientos similares para determinar el grado de acetilación en N del polisacárido. Los grupos O-acetilo pueden eliminarse por hidrólisis, por ejemplo mediante tratamiento con una base tal como hidrazina anhidra [66] o NaOH [60]. Se pueden usar procedimientos similares para eliminar los grupos N-acetilo. Para mantener altos niveles de acetilación en O en los polisacáridos capsulares tipo 5

y/u 8, se minimizan los tratamientos que conducen a la hidrólisis de los grupos O-acetilo, por ejemplo, tratamientos en extremos de pH.

5 Los polisacáridos capsulares se pueden purificar por técnicas conocidas, como se describe en las referencias en este documento. Un proceso típico implica la inactivación con fenol-etanol de células de *S. aureus*, centrifugación, tratamiento con lisostafina, tratamiento con RNasa/DNasa, centrifugación, diálisis, tratamiento con proteasa, diálisis adicional, filtración, precipitación con etanol/CaCl<sub>2</sub>, diálisis, liofilización, intercambio aniónico cromatografía, diálisis, liofilización, cromatografía de exclusión por tamaño, diálisis y liofilización [67]. Un proceso alternativo implica someter a autoclave a células *S. aureus*, ultrafiltración del sobrenadante que contiene polisacárido, concentración, liofilización, tratamiento con metaperyodato de sodio para eliminar el ácido teicoico, ultrafiltración adicional, diafiltración, 10 cromatografía líquida de exclusión por tamaño de alto rendimiento, diálisis y liofilización [68].

10 La divulgación no se limita a los polisacáridos purificados de fuentes naturales, sin embargo, y los polisacáridos pueden obtenerse por otros procedimientos, tales como síntesis total o parcial.

#### *Otros sacáridos capsulares bacterianos*

15 Otros sacáridos capsulares bacterianos de ejemplo incluyen los de *Haemophilus influenzae* Tipo b, *Salmonella enterica* Typhi Vi y *Clostridium difficile*.

#### *Carbohidrato de *S. pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A o GAS)*

20 La divulgación también puede usar sacáridos bacterianos no capsulares. Un ejemplo de sacáridos bacterianos no capsulares es el carbohidrato GAS de *S. pyogenes* (también conocido como el polisacárido de pared celular GAS o GASP). Este sacárido presenta una estructura ramificada con una cadena principal de L-ramnopiranosa (Rhap) que consiste en enlaces alfa-(1→2) y alfa-(1→3) alternos y residuos de D-N-acetilglucosamina (GlcNAc) beta-(1→3)-conectado a anillos de ramnosa alternos ([69]).

25 El carbohidrato de GAS generalmente estará en su forma nativa, pero puede haber sido modificado. Por ejemplo, el sacárido puede ser más corto que el carbohidrato de GAS nativo, o puede modificarse químicamente.

30 Por lo tanto, el sacárido usado según la descripción puede ser un carbohidrato de GAS sustancialmente de longitud completa, como se encuentra en la naturaleza, o puede ser más corto que la longitud natural. Los polisacáridos de longitud completa se pueden despolimerizar para dar fragmentos más cortos para su uso con la divulgación, por ejemplo, por hidrólisis en ácido suave, por calentamiento, por cromatografía de tamaño, etc. Se ha propuesto un fragmento corto que se corresponde con la unidad terminal del carbohidrato de GAS para su uso en una vacuna [70]. En consecuencia, se prevén fragmentos cortos en la presente divulgación. Sin embargo, se prefiere usar sacáridos de longitud sustancialmente de longitud completa. El carbohidrato de GAS tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 10, 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, como los disponibles en Polymer Standard Service [71].

35 35 El sacárido puede modificarse químicamente en relación con el carbohidrato de GAS como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el sacárido puede estar desacetilado en N (parcial o totalmente), propionado en N (parcial o totalmente), etc. El efecto de la desacetilación, etc., por ejemplo en la inmunogenicidad, puede evaluarse mediante ensayos de rutina.

#### *Derivatización*

40 40 La presente divulgación se refiere en parte a un procedimiento de derivatización de un sacárido que comprende unir un grupo cicloalquino de ocho miembros al sacárido.

45 45 El grupo cicloalquino de ocho miembros está unido al sacárido mediante un enlace covalente. Típicamente, el grupo cicloalquino de ocho miembros se une mediante un espaciador. El grupo cicloalquino de ocho miembros está típicamente en un término del espaciador. El otro término del espaciador tiene un grupo funcional para la unión al sacárido. La naturaleza del grupo funcional dependerá del sacárido, en particular del grupo o grupos disponibles en el sacárido para la unión. La unión del grupo cicloalquino de ocho miembros se puede llevar a cabo utilizando cualquier procedimiento adecuado dependiendo de la naturaleza del sacárido y, cuando se usa un espaciador, el grupo funcional en el espaciador.

50 50 Por ejemplo, si el sacárido contiene una amina, el espaciador puede incluir cualquier grupo funcional que permita la unión a una amina (por ejemplo, un éster de succinimidilo). De manera similar, si el sacárido contiene un aldehído, el espaciador puede incluir cualquier grupo funcional que permita la unión a un aldehído (por ejemplo, una amina).

En algunas realizaciones, el grupo cicloalquino de ocho miembros incluye uno o más átomos de nitrógeno, tales como 1, 2 o 3 átomos de nitrógeno. En algunas realizaciones, el grupo cicloalquino de ocho miembros se fusiona a uno o más de otros sistemas de anillo, tales como ciclopropano o benceno. En una realización preferente, el grupo cicloalquino de ocho miembros se fusiona a un grupo ciclopropano. En otra realización preferente, el grupo cicloalquino

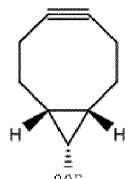
de ocho miembros se fusiona a dos grupos benceno. En las realizaciones más preferentes, el grupo cicloalquino de ocho miembros es un grupo ciclooctino.

En una realización, la unión se lleva a cabo usando 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 sacárido, y  $L$  es una fracción de enlace en el espaciador.

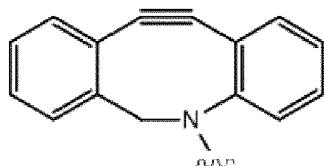
En algunas realizaciones preferentes,  $X_2$  es N-oxisuccinimida. Este grupo es adecuado para la unión a una amina en un sacárido. En otras realizaciones,  $X_2$  puede ser un grupo amina, que es adecuado para la unión a un aldehído en un sacárido.  $L$  puede ser un alquilo de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>) por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-L típicamente tiene la fórmula -L<sup>3</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>1</sup>- en la que L<sup>1</sup> es carbonilo, L<sup>2</sup> es un alquilo de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>) por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>- o L<sup>2</sup> está ausente, y L<sup>3</sup> es -NHC(O)-, carbonilo u -O(CH<sub>3</sub>)-.

En una realización preferente, L<sup>1</sup> es carbonilo, L<sup>2</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>- y L<sup>3</sup> es -NHC(O)-. En otra realización preferente, L<sup>1</sup> es carbonilo, L<sup>2</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- y L<sup>3</sup> es carbonilo. En otra realización preferente, L<sup>1</sup> es carbonilo, L<sup>2</sup> está ausente y L<sup>3</sup> es -O(CH<sub>3</sub>)-.

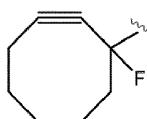
15 En una realización, X<sub>1</sub> es:



En otra realización, X<sub>1</sub> es:

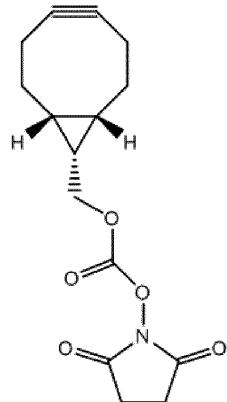


Preferiblemente, X<sub>1</sub> es:

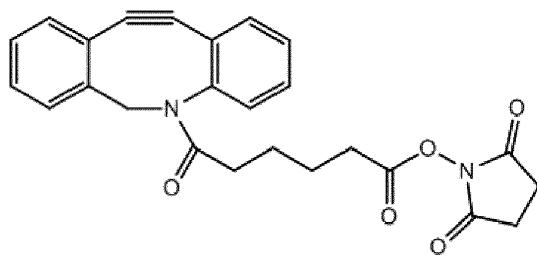


20

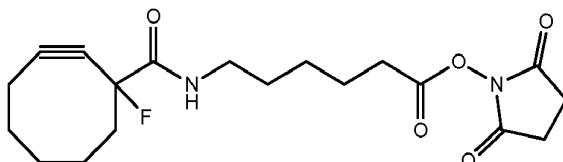
Un compuesto preferido que tiene la fórmula X<sub>1</sub>-L-X<sub>2</sub> es:



Otro compuesto preferido que tiene la fórmula X<sub>1</sub>-L-X<sub>2</sub> es:



Un compuesto particularmente preferido que tiene la fórmula  $X_1$ -L- $X_2$  es:



Se puede requerir la derivatización del sacárido para introducir grupos funcionales tales como aminas y aldehídos. En algunas realizaciones, la unión del grupo cicloalquino de ocho miembros al sacárido está precedida por la oxidación del sacárido para introducir un grupo aldehído en al menos un residuo de sacárido en el sacárido. Este paso puede implicar la introducción de más de un grupo aldehído en el sacárido.

Por ejemplo, los sacáridos capsulares de GBS no incluyen un grupo aldehído en su forma natural, por lo que normalmente se genera antes de la unión del grupo ciclooctino por oxidación (por ejemplo, oxidación de peryodato) de una porción (por ejemplo, entre 5 y 40 %, particularmente entre 10 y 30 %, preferiblemente aproximadamente 20 %) de los residuos de ácido siálico del sacárido [72]. Alternativamente, si el procedimiento usa un sacárido capsular del serotipo V que está desialilado, entonces se puede generar un grupo aldehído en este sacárido antes de la unión del grupo cicloalquino de ocho miembros por oxidación (por ejemplo, oxidación de peryodato) de una porción (por ejemplo, entre 5 y 40 %, particularmente entre 10 y 30 %, preferiblemente aproximadamente 20 %) de los residuos de galactosa del sacárido [10].

Las reacciones típicas para producir aldehídos incluyen el uso de sales de peryodato, y particularmente meta-periodatos (por ejemplo, meta-periodato de sodio o potasio, por ejemplo,  $\text{NaO}_4$ ), para oxidar grupos hidroxilo [73]. El experto en la materia sería capaz de identificar condiciones adecuadas para la oxidación.

La oxidación del sacárido puede ir seguida de una etapa de aminación reductora, por ejemplo, si es deseable proporcionar una amina en el sacárido para su unión a un espaciador.

La aminación reductiva es una técnica estándar en química orgánica. En una realización, un grupo aldehído en el residuo de sacárido reacciona con un grupo amina en el espaciador. Esto se puede lograr convenientemente combinando el polisacárido con el espaciador en presencia de un agente reductor apropiado (por ejemplo, cianoborohidruros, tales como cianoborohidruro de sodio  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ; borano-piridina; triacetoxiborohidruro de sodio; resina de intercambio de borohidruro; etc.). En otra realización, un grupo aldehído se convierte en un grupo amina por aminación reductora para proporcionar un grupo amina para la unión del espaciador. La aminación reductora implica amoníaco o una amina primaria ( $\text{NH}_2\text{R}$ ). Esto se puede lograr convenientemente usando una sal de amonio (por ejemplo, cloruro de amonio) en combinación con un agente reductor apropiado (por ejemplo, como se enumeró anteriormente). El experto en la materia sería capaz de identificar condiciones adecuadas para la aminación reductiva. Por ejemplo, los inventores han descubierto que el tratamiento de polisacárido a 10 mg/ml con proteína transportadora a una proporción de polisacárido:proteína 4:1 (p/p) y  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  a una proporción de polisacárido:  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  2:1 es adecuado.

Cuando se usa un espaciador, el derivativo de sacárido comprenderá una fracción espaciadora. La fracción espaciadora puede incluir átomos tales como carbono, hidrógeno, oxígeno y/o nitrógeno. Los espaciadores que comprenden carbono e hidrógeno son típicos, y también se usan típicamente espaciadores que comprenden además oxígeno y/o nitrógeno. Los espaciadores que incluyen átomos de nitrógeno pueden incluir un átomo de carbono unido a un átomo de nitrógeno, que a su vez está unido a un segundo átomo de carbono (-C-N-C-). Los espaciadores que incluyen un átomo de oxígeno generalmente lo incluyen como parte de un grupo carbonilo. Las unidades estructurales espaciadoras con un peso molecular de entre 30 y 500 Da son típicos. Los espaciadores que contienen dos grupos carbonilo también son típicos.

Una fracción espaciadora útil puede ser  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ , en la que  $n$  es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. El valor de  $n$  es típicamente 5. El terminal  $-\text{NH}-$  en este espaciador generalmente está unido a un átomo de carbono de la fracción polisacárido. El terminal  $-\text{C}(\text{O})-$  en este espaciador generalmente está unido al grupo ciclooctino. Una fracción espaciadora preferida se puede introducir convenientemente mediante un proceso que implica: aminación reductora del aldehído en el residuo de sacárido oxidado; reacción del grupo  $-\text{NH}_2$  resultante con un espaciador bifuncional que

es un diéster (por ejemplo, un éster disuccinimidílico) de un ácido dioico (por ejemplo, de ácido adípico, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOH); y aminación reductiva del producto ([74]).

Otras químicas que se pueden usar para unir un espaciador a un grupo -NH<sub>2</sub> en el sacárido, incluyen:

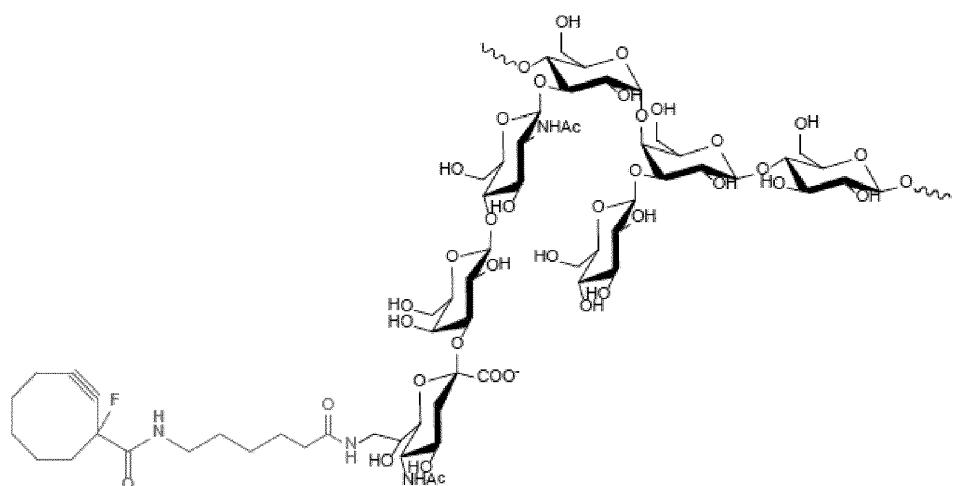
- 5 - acriloilación (por ejemplo, por reacción con cloruro de acriloilo), seguido de la adición de tipo Michael a  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> o a -SH [75]. La fracción espaciadora resultante es -NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(propionamido).
- reacción con un haloacilhaluro, seguido de reacción con el  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> o con un -SH [76]. La fracción espaciadora es -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-.

El procedimiento de derivatización de un sacárido de acuerdo con la descripción puede dar el sacárido como se describe a continuación.

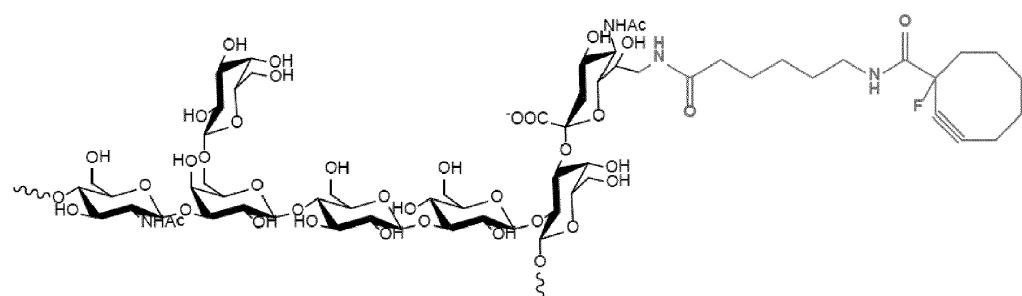
10 El derivativo de sacárido

La divulgación proporciona un derivativo de sacárido que comprende un grupo cicloalquino de ocho miembros. El derivativo de sacárido puede incluir cualquier sacárido y, cuando sea apropiado, un espaciador, como se describe anteriormente. La divulgación también proporciona un derivativo de sacárido obtenido u obtenible por el procedimiento descrito anteriormente. El derivativo de sacárido no es un sacárido natural.

- 15 Los derivativos de sacárido preferidos incluyen un sacárido capsular de *Streptococcus agalactiae* ("GBS"). En realizaciones particularmente preferentes, el sacárido es un sacárido capsular de *Streptococcus agalactiae* ("GBS") serotipo II o V. En una realización, el derivativo de sacárido es un derivativo de GBS que tiene la siguiente estructura:



En otra realización, el derivativo de sacárido es un derivativo de GBS que tiene la siguiente estructura:



20

Procedimiento de conjugación

La descripción se refiere en parte a un procedimiento de conjugación de un derivativo de sacárido como se definió anteriormente a una fracción que contiene azida, que comprende hacer reaccionar el grupo cicloalquino de ocho miembros con la azida para formar un enlace triazol. En algunas realizaciones, el derivativo de sacárido usado en el procedimiento de conjugación se produce de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. En particular, el derivativo de sacárido puede producirse uniendo un grupo cicloalquino de ocho miembros al sacárido. El procedimiento de conjugación se lleva a cabo típicamente en ausencia de un catalizador metálico, tal como un catalizador de cobre.

Los inventores han descubierto que un procedimiento de conjugación adecuado implica mezclar proteínas (típicamente a una concentración de 5 mg/ml) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), con sacárido (típicamente solubilizado en agua a una concentración de aproximadamente 25-30 mg/ml). Típicamente, la mezcla de proteína y sacárido se agitará durante aproximadamente 6-12 horas a temperatura ambiente.

- 5 El procedimiento de conjugar un derivativo de sacárido con una fracción que contiene azida se produce mediante una reacción de cicloadición [3+2]. Esta reacción se ve facilitada por la tensión del anillo en el cicloalquino de ocho miembros, que promueve la reacción de cicloadición de azida-alquino en ausencia de un catalizador de cobre. Los inventores han descubierto que este procedimiento de conjugación es particularmente eficiente, y es capaz de producir conjugados en niveles superiores a los que se podían lograr utilizando procedimientos de conjugación clásicos. Los procedimientos generales para la conjugación utilizando una reacción de cicloadición [3+2] son conocidos en la técnica y se describen en la referencia 77.
- 10

El procedimiento de conjugar un derivativo de sacárido con una fracción que contiene azida puede dar un conjugado como se describe a continuación.

*Fracción que contiene azida*

- 15 Típicamente, la fracción que contiene azida es una molécula portadora, tal como una proteína. La fracción que contiene azida se puede preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, los procedimientos descritos en la referencia 78.

20 Las proteínas transportadoras útiles incluyen toxinas bacterianas o toxoides, tales como el toxoide diftérico o el toxoide tetánico. También se pueden usar fragmentos de toxinas o toxoides, por ejemplo, fragmento C del toxoide tetánico [79]. Por ejemplo, el mutante CRM197 de la toxina diftérica [80-82] es útil con la descripción. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [83], péptidos sintéticos [84,85], proteínas de choque térmico [86,87], proteínas de los ferina [88,89], citoquinas [90], linfoquinas [90], hormonas [90], factores de crecimiento [90], albúmina sérica humana (preferiblemente recombinante), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de células T CD4+ humanas de diversos antígenos derivativos de patógenos [91] como N19 [92], proteína D de *H. influenzae* [93,94], proteína de superficie neumocócica PspA [95], neumolisin [96], proteínas de absorción de hierro [97], toxina A o B de *C. difficile* [98], exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) [99], una proteína GBS [100], etc. En realizaciones preferentes, la proteína transportadora es una proteína GBS, tal como GBS67 y GBS80 [101].

25

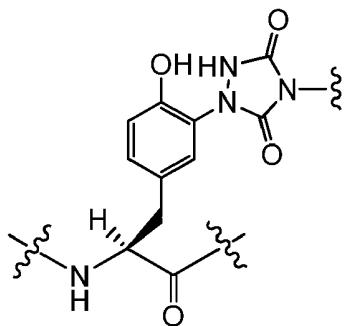
30 Típicamente, la fracción que contiene azida incluye un espaciador. La azida está típicamente presente como un grupo terminal en la fracción que contiene azida, de modo que está disponible para participar en las reacciones de conjugación como se describe en el presente documento.

35 Se usan espaciadores para unir un grupo azida a la fracción. Los procedimientos para unir un espaciador a una molécula transportadora, como una proteína, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la referencia 78).

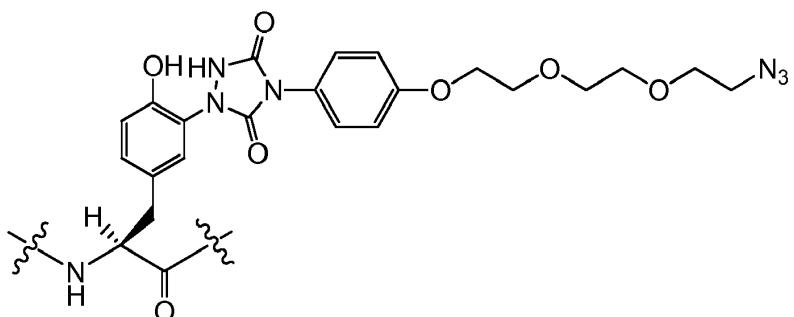
40 El espaciador puede ser un alquilo de cadena lineal con 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>) por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- . En algunas realizaciones preferentes, el espaciador tiene la fórmula  $-[(CH_2)_2O]_n-$ , donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Adecuadamente, n es 3.

45 Cuando se usa un espaciador, la fracción que contiene azida comprenderá una fracción espaciador. La fracción espaciadora puede incluir átomos tales como carbono, hidrógeno, oxígeno y/o nitrógeno. Los espaciadores que comprenden carbono e hidrógeno son típicos, y también se usan típicamente espaciadores que comprenden además oxígeno y/o nitrógeno. Los espaciadores que incluyen átomos de nitrógeno pueden incluir un átomo de carbono unido a un átomo de nitrógeno, que a su vez está unido a un segundo átomo de carbono (-C-N-C-). Los espaciadores que incluyen un átomo de oxígeno generalmente lo incluyen como parte de un grupo carbonilo. Las unidades estructurales espaciadoras con un peso molecular de entre 30 y 500 Da son típicos. Los espaciadores que contienen dos grupos carbonilo también son típicos. Una fracción espaciadora particularmente útil incluye  $-[(CH_2)_2O]_n-$ , donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Adecuadamente, n es 3.

50 En realizaciones preferentes, la fracción que contiene azida contiene uno o más aminoácidos derivativos, tales como uno o más residuos de tirosina derivatizados. Los procedimientos adecuados de derivatización de residuos de tirosina se describen en PCT/US2012/045549. En realizaciones preferentes, la fracción que contiene azida es una proteína transportadora en la que la azida se une a la proteína a través de un espaciador. La fracción que contiene azida puede ser una proteína transportadora en la que la azida se une a un residuo de tirosina derivatizado en la proteína a través de un espaciador. Los inventores han descubierto que la unión de la azida a una proteína transportadora a través de un residuo de tirosina en la proteína es particularmente preferida. En algunas realizaciones, la fracción que contiene azida es una proteína transportadora que contiene al menos un residuo de tirosina derivatizado que tiene la siguiente estructura, en la que la azida se une a través de la 3H-1,2,4-triazol-3,5(4H)-diona:



Por ejemplo, la fracción que contiene azida puede ser una proteína transportadora que contiene al menos un residuo de tirosina derivatizado que tiene la siguiente estructura:



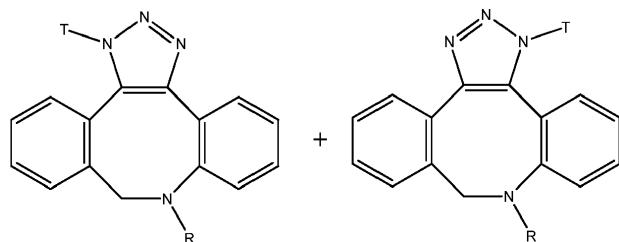
- 5 La divulgación también proporciona unidades estructurales que contienen azida como se describe en el presente documento.

#### Conjugados

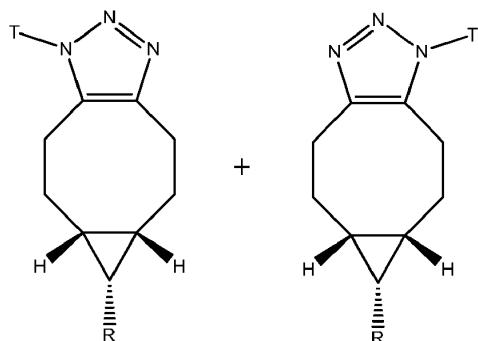
- 10 La divulgación se refiere en parte a un conjugado de un derivativo de sacárido como se definió anteriormente y una fracción que contiene azida como se definió anteriormente, en la que el conjugado tiene la fórmula R-S-T, en el que R comprende un residuo del derivativo de sacárido, S es un triazol grupo fusionado a un grupo cicloalquilo de ocho miembros y T comprende un residuo de la fracción que contiene azida.

- 15 En algunas realizaciones, el grupo cicloalquilo de ocho miembros incluye uno o más átomos de nitrógeno, tales como 1, 2 o 3 átomos de nitrógeno. En algunas realizaciones, el grupo cicloalquilo de ocho miembros se fusiona a uno o más sistemas de anillo adicionales además del grupo triazol, tal como ciclopropano o benceno. En una realización preferente, el grupo cicloalquino de ocho miembros se fusiona a un grupo ciclopropano además del grupo triazol. En otra realización preferente, el grupo cicloalquino de ocho miembros se fusiona a dos grupos benceno además del grupo triazol.

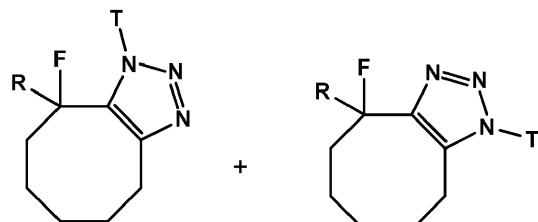
En una realización preferente, R-S-T es:



- 20 En otra realización preferente, R-S-T es:



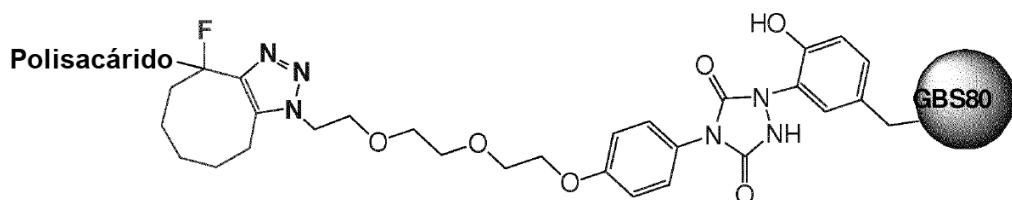
En una realización más preferente, R-S-T es:



- 5 La fracción es típicamente una molécula portadora, tal como una proteína. Las proteínas transportadoras adecuadas se describen anteriormente. El conjugado puede incluir un espaciador en el residuo del derivativo de sacárido entre el sacárido y S. Por ejemplo, el espaciador puede ser un espaciador como se describió anteriormente para el derivativo de sacárido. Además o alternativamente, el conjugado puede incluir un espaciador en el residuo de la fracción que contiene azida entre la fracción y S. Por ejemplo, el espaciador puede ser un espaciador como se describió anteriormente para la fracción que contiene azida. Típicamente, el conjugado incluirá un espaciador en el residuo del derivativo de sacárido entre el sacárido y S y un espaciador en el residuo de la fracción que contiene azida entre la fracción y S.
- 10

En una realización particularmente preferente, el conjugado incluye el sacárido del serotipo V de GBS conjugado con la proteína GBS80. En otra realización particularmente preferente, el conjugado incluye sacárido de serotipo II de GBS conjugado con proteína GBS80. En otra realización particularmente preferente, el conjugado incluye el sacárido del serotipo V de GBS conjugado con la proteína GBS67. En otra realización particularmente preferente, el conjugado incluye sacárido de serotipo II de GBS conjugado con proteína GBS67.

Por ejemplo, el conjugado puede tener la siguiente estructura:



- 20 El conjugado puede obtenerse u obtenerse por el procedimiento de conjugar un derivativo de sacárido con una fracción que contiene azida como se describió anteriormente.

En algunas realizaciones, los conjugados pueden tener un exceso de proteína transportadora (p/p) o un exceso de sacárido (p/p), por ejemplo, en el rango de proporción de 1:5 a 5:1. El conjugado puede incluir pequeñas cantidades de proteína transportadora libre (es decir, no conjugada). Cuando una proteína transportadora dada está presente tanto en forma libre como conjugada en una composición de la divulgación, la forma no conjugada es preferiblemente no más del 5 % de la cantidad total de la proteína transportadora en la composición como un todo, y más preferiblemente presente en menos del 2 % (en peso). Cuando el conjugado está comprendido dentro de una composición farmacéutica de la divulgación, la composición también puede comprender proteína transportadora libre como inmunógeno [102]. Después de la conjugación, los antígenos libres y conjugados se pueden separar. Existen muchos procedimientos adecuados, por ejemplo, cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [ver también las referencias. 103, 104 etc.].

*Combinaciones de conjugados y otros antígenos*

Además de proporcionar conjugados individuales como se describe anteriormente, la divulgación proporciona una composición que comprende un conjugado de la divulgación y uno o más antígenos adicionales. La composición es típicamente una composición inmunogénica.

- 5 Las composiciones de la divulgación pueden comprender además uno o más antígenos adicionales, que incluyen antígenos bacterianos, virales o parasitarios adicionales. Estos pueden seleccionarse entre los siguientes:
- un antígeno proteico del serogrupo B de *N. meningitidis*, como los de las referencias. 105 a 111, prefiriéndose particularmente la proteína '287' (véase más abajo) y derivativos (por ejemplo, 'ΔG287').
  - una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) del serogrupo B de *N. meningitidis*, como las descritas en las referencias. 112, 113, 114, 115 etc.
- 10 - un antígeno sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como el oligosacárido descrito en la referencia 116 del serogrupo C o los oligosacáridos de la referencia 117)
- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, referencias. 118-120; capítulos 22 y 23 de la referencia 127].
  - un antígeno del virus de la hepatitis A, como el virus inactivado [por ejemplo, 121, 122; capítulo 15 de la referencia 127].
  - un antígeno del virus de la hepatitis B, como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ejemplo, 122.123; capítulo 16 de la referencia 127].
  - un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo, 124].
- 20 - un antígeno de *Bordetella pertussis*, como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, referencias 125 y 126; capítulo 21 de la referencia 127].
- un antígeno de difteria, como un toxoide de difteria [por ejemplo capítulo 13 de la referencia 127].
  - un antígeno tetánico, como un toxoide tetánico [por ejemplo capítulo 27 de la referencia 127].
  - un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo capítulo 14 de la referencia 127]
- 25 - un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo 105, 106, 107].
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134].
  - un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo 135].
  - un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo 136].
  - antígeno(s) de polio [por ejemplo 137, 138; capítulo 24 de la referencia 127] como IPV.
- 30 - antígeno(s) de rabia [por ejemplo 139] como el virus inactivado liofilizado [por ejemplo 140, RabAvert™].
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubéola [por ejemplo capítulos 19, 20 y 26 de la referencia 127].
  - antígeno(s) de influenza [por ejemplo, capítulos 17 y 18 de la referencia 127], como las proteínas de superficie de hemaglutinina y/o neuraminidasa.
  - un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo 141].
- 35 - un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo 142, 143, 144].
- un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 145-147].
  - un antígeno de *S. epidermidis* [por ejemplo sacárido tipo I, II y/o III obtenible de las cepas ATCC-31432, SE-360 y SE-10 como se describe en las referencias. 148, 149 y 150].

40 Cuando se usa un antígeno de sacárido o carbohidrato, preferiblemente se conjuga con un vehículo para mejorar la inmunogenicidad. La conjugación de *Hinfluenzae* B, antígenos de sacárido meningocócico y neumocócico es bien conocida.

Los antígenos proteicos tóxicos se pueden desintoxicar cuando sea necesario (por ejemplo, desintoxicación de la toxina pertussis por medios químicos y/o genéticos [126]).

Cuando se incluye un antígeno de difteria en la composición, también se prefiere incluir antígeno de tétanos y antígenos de tosferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno tetánico, se prefiere también incluir antígenos de difteria y tosferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de tosferina, se prefiere también incluir antígenos de difteria y tétanos.

- 5 Los antígenos pueden adsorberse a una sal de aluminio. Cuando hay más de un conjugado en una composición, no todos los conjugados necesitan ser adsorbidos.

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

- 10 Como alternativa al uso de antígenos de proteínas en la composición de la divulgación, se puede usar ácido nucleico que codifica el antígeno [por ejemplo, referencias [151 a 159]. Por lo tanto, los componentes proteicos de las composiciones de la divulgación pueden reemplazarse por ácido nucleico (preferiblemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica la proteína. En términos prácticos, puede haber un límite superior para el número de antígenos incluidos en las composiciones de la divulgación. El número de antígenos en una composición de la divulgación puede ser inferior a 20, inferior a 19, inferior a 18, inferior a 17, inferior a 16, inferior a 15, inferior a 14, inferior a 13, inferior a 12, inferior a 11, menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, menos de 5, menos de 4 o menos de 3. El número de antígenos en una composición de la divulgación puede ser menos de 6, menos de 5 o menos de 4.
- 15

*Composiciones y procedimientos farmacéuticos*

- 20 La divulgación proporciona procesos para preparar composiciones farmacéuticas, que comprenden los pasos de mezclar el conjugado de la divulgación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" típicos incluyen cualquier portador que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los portadores adecuados son típicamente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, sacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, lactosa y agregados lipídicos (como gotas de aceite o liposomas). Dichos portadores son bien conocidos por los expertos en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, como agua, solución salina, glicerol, etc. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH y similares. La solución salina fisiológica estéril, libre de pirógenos y tamponada con fosfato es un vehículo típico. Una discusión exhaustiva de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 160.
- 25

30 Las composiciones de la divulgación pueden estar en forma acuosa (es decir, soluciones o suspensiones) o en forma seca (por ejemplo, liofilizada). Si se usa una vacuna seca, se reconstituirá en un medio líquido antes de la inyección. La liofilización de vacunas conjugadas se conoce en la técnica, por ejemplo, el producto Menjugate™ se presenta en forma liofilizada, mientras que NeisVac-C™ y Meningitec™ se presentan en forma acuosa. Para estabilizar los conjugados durante la liofilización, puede ser típico incluir un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), por ejemplo entre 1 mg/ml y 30 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 25 mg/ml) en la composición.

35

- 35 Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse en viales o en jeringas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una dosis única de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis única o dosis múltiples.
- 40

40 Las composiciones acuosas de sacáridos de la divulgación son adecuadas para reconstituir otras vacunas a partir de una forma liofilizada. Cuando se va a utilizar una composición de la divulgación para dicha reconstitución extemporánea, la divulgación proporciona un proceso para reconstituir dicha vacuna liofilizada, que comprende la etapa de mezclar el material liofilizado con una composición acuosa de la divulgación. El material reconstituido puede usarse para inyección.

45

45 Las composiciones de la divulgación se pueden empaquetar en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiple. Para formas de dosis múltiples, se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Los volúmenes de dosificación efectivos pueden establecerse de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición tiene un volumen de 0,5 ml, por ejemplo, para inyección intramuscular.

- 50 El pH de la composición está típicamente entre 6 y 8, por ejemplo, aproximadamente 7. Se puede mantener un pH estable mediante el uso de un tampón. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, es típico usar un tampón de histidina [161]. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la divulgación pueden ser isotónicas con respecto a los humanos.
- 55

55 Las composiciones de la divulgación son inmunogénicas, y más preferiblemente son composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo con la descripción pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir infecciones) o terapéuticas (es decir, para tratar infecciones), pero típicamente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de antígeno(s), así como cualquier otro componente,

según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente efectiva" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía según la salud y la condición física del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primates no humanos, primates, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico tratante sobre la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un rango relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos de rutina.

Dentro de cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual generalmente estará entre 1-50 µg (medido como masa de sacárido) por ejemplo, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg.

Las composiciones de la divulgación pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas. La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como inhalador, usando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como spray, gotas, gel o polvo [por ejemplo, referencias 162 y 163].

El éxito con la administración nasal de sacáridos neumocócicos [164,165], sacáridos Hib [166], sacáridos MenC [167] y mezclas de conjugados de sacáridos Hib y MenC [168].

Las composiciones de la divulgación pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se envasa en formato de dosis múltiple.

Las composiciones de la divulgación pueden comprender detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), como Tween 80. Los detergentes generalmente están presentes en niveles bajos, por ejemplo, <0,01 %.

Las composiciones de la divulgación pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Una concentración de 10±2 mg/ml de NaCl es típica.

Las composiciones de la divulgación generalmente incluirán un tampón. Un tampón fosfato es típico.

Las composiciones de la divulgación generalmente se administrarán junto con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán habitualmente uno o más adyuvantes. Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a:

#### *Composiciones que contienen minerales*

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La divulgación incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo capítulos 8 y 9 de la referencia 169], o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso de fosfato), con los compuestos tomando cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalino, amorfo, etc.), y con adsorción a la(s) sal(es) típica. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [170].

Las sales de aluminio pueden incluirse en las vacunas de la divulgación de modo que la dosis de Al<sup>3+</sup> esté entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

Un adyuvante de fosfato de aluminio típico es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO<sub>4</sub>/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de Al<sup>3+</sup>/ml. Se puede usar la adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio, por ejemplo entre 50 y 100 µg de Al<sup>3+</sup> por conjugado por dosis. Cuando se utilizó un fosfato de aluminio y se desea no adsorber un antígeno al adyuvante, esto se ve favorecido al incluir iones de fosfato libres en la solución (por ejemplo, mediante el uso de un tampón de fosfato).

#### *Emulsiones en aceite*

Las composiciones de emulsión oleosa adecuadas para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80 y 0,5 % de Span 85, formulado en partículas submicrónicas usando un microfluidizador) [Capítulo 10 de referencia 169; también referencias 171-173]. MF59 se usa como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente del virus de la gripe FLUAD™.

Los adyuvantes particularmente útiles para su uso en las composiciones son emulsiones submicrométricas de aceite en agua. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para su uso en la presente invención son emulsiones de escualeno-agua que opcionalmente contienen cantidades variables de MTP-PE, tal como una emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene 4-5 % p/v de escualeno, 0,25-1,0 % p/v Tween 80 (monooleato de polioxietilenosorbitano) y/o 0,25-1,0 % de Span 85 (trioleato de sorbitán) y, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isogluatminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforofiloxi)-etilamina (MTP-PE). Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua, los procedimientos de fabricación de los mismos y los agentes

inmunoestimulantes, como los péptidos de muramilo, para su uso en las composiciones, se describen en detalle en las referencias 171 y 174-175.

El adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) también pueden usarse como adyuvantes en la divulgación.

5 *Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la referencia 169]*

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la divulgación. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroles y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina han sido ampliamente estudiadas como adyuvantes. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, como QS21, así como formulaciones lipídicas, como ISCOM.

10 Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas que utilizan estas técnicas, incluidas QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se describe en la referencia 176. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, como el colesterol [177].

15 Las combinaciones de saponinas y colesteroles se pueden usar para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia 169]. Los ISCOM típicamente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida se puede usar en ISCOM. Preferiblemente, ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen más detalladamente en las referencias 177-179. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente(s) adicional(es) [180].

20 Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en las referencias 181 y 182.

*Virosomas y partículas similares a virus*

25 Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también se pueden usar como adyuvantes en la divulgación. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Generalmente no son patógenos, no se replican y generalmente no contienen ninguno del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la influenza (como HA o NA), el virus de la hepatitis B (como las proteínas centrales o de la cápside), el virus de la hepatitis E, el virus del sarampión, el virus Sindbis, el rotavirus, el virus de la enfermedad de pie y boca, retrovirus, virus Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fagos Q $\beta$  (como las proteínas de la cubierta), fagos GA, fagos fr, fagos AP205 y Ty (como la proteína Ty del retrotransposón p1). Los VLP se analizan más adelante en las referencias 183-188. Los virosomas se analizan más adelante, por ejemplo, en la referencia 189.

*Derivativos bacterianos o microbianos*

35 Los adyuvantes adecuados para su uso en la divulgación incluyen derivativos bacterianos o microbianos tales como derivativos no tóxicos de liposacárido enterobacteriano (LPS), derivativos de lípidos A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas de ribosilación de ADP y derivativos destoxificados de los mismos.

40 Los derivativos no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL desacilada en 3-O (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de 3 monofosforil lípido A desacilado en O con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma preferida de "partícula pequeña" de monofosforil lípido A 3 desacilado en O se describe en la referencia 190. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas como para ser esterilizadas a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m [190]. Otros derivativos de LPS no tóxicos incluyen imitadores de monofosforil lípido A, tales como derivativos de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529 [191,192].

45 Los derivativos del lípido A incluyen derivativos del lípido A de *Escherichia coli* tal como OM-174. OM-174 se describe por ejemplo en las referencias 193 y 194.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina). También se ha demostrado que los ARN bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli (dG) son inmunoestimuladores.

50 Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 195, 196 y 197 describen posibles sustituciones analógicas, por ejemplo, reemplazo de guanosina con 2'-desoxi-7-deazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en las referencias 198-203.

La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [204]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, como un ODN CpG-B. Los ODN de CpG-A y CpG-B se analizan en las referencias 205-207. Preferiblemente, el CpG es un ODN CpG-A.

5 Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, se pueden unir dos secuencias de oligonucleótidos CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros" (por ejemplo, referencias 204 y 208-210).

10 Las toxinas de ribosilación ADP bacterianas y sus derivativos destoxicificados se pueden usar como adyuvantes en la divulgación. Preferiblemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina lóbil de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o tosferina ("PT"). El uso de toxinas de ADP-ribosilación destoxicificadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la referencia 211 y como adyuvantes parenterales en la referencia 212. La toxina o toxoide está preferiblemente en forma de una holotoxina, que comprende las subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferiblemente la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante LT destoxicificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y sus derivativos destoxicificados, 15 particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se pueden encontrar en las referencias 213-220. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferiblemente en las alineaciones de las subunidades A y B de las toxinas ADP-ribosilantes expuestas en la referencia 221, específicamente incorporado aquí como referencia en su totalidad.

#### *Inmunomoduladores humanos*

20 Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [222], etc.) [223], interferones (por ejemplo, interferón- $\gamma$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

#### *Bioadhesivos y Mucoadhesivos*

25 Los bioadhesivos y mucoadhesivos también se pueden usar como adyuvantes en la divulgación. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [224] o mucoadhesivos tales como derivativos reticulados de polí(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y sus derivativos también pueden usarse como adyuvantes en la divulgación [225].

#### *Micropartículas*

30 Las micropartículas también se pueden usar como adyuvantes en la divulgación. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150  $\mu$ m de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm a ~30  $\mu$ m de diámetro, y lo más preferiblemente de ~500 nm a ~10  $\mu$ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólico), opcionalmente tratadas para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, como CTAB).

#### *Liposomas (capítulos 13 y 14 de la referencia 169)*

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para su uso como adyuvantes se describen en las referencias 226-228.

#### *Polioxietilenéter y formulaciones de éster de polioxietileno*

40 Los adyuvantes adecuados para su uso en la divulgación incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [229]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol [230], así como polioxietilen alquil éteres o tensioactivos de éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [231]. Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoril éter, polioxietilen-8-esteoril éter, polioxietilen-4-lauril éter, polioxietilen-35-lauril éter y polioxietilen-23-lauril éter.

#### *Polifosfazeno (PCPP)*

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las referencias 232 y 233.

#### *Péptidos de Muramilo*

50 Ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

#### *Compuestos de imidazoquinolona*

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para usar adyuvantes en la divulgación incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos más adelante en las referencias 234 y 235.

*Compuestos de tiosemicarbazona*

5 Ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como los procedimientos de formulación, fabricación y selección de compuestos todos adecuados para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen los descritos en la referencia 236. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, como el TNF- $\alpha$ .

*Compuestos de triptantrina*

10 Ejemplos de compuestos de triptantrina, así como los procedimientos de formulación, fabricación y selección de compuestos todos adecuados para su uso como adyuvantes en la divulgación incluyen los descritos en la referencia 237. Los compuestos de triptantrina son particularmente efectivos en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, como TNF- $\alpha$ .

15 La divulgación también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes combinaciones pueden usarse como composiciones adyuvantes en la divulgación: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [238]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivativo de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [239]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivativo de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esterol) [240]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [241]; (6) SAF, que contiene 10 % de escualano, 0,4 % de Tween 80<sup>TM</sup>, 5 % de polímero de bloque plurónico L121 y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula. (7) Sistema adyuvante Ribi<sup>TM</sup> (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), trehalosa dimicrolato (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox<sup>TM</sup>); y (8) una o más sales minerales (como una sal de aluminio) + un derivativo no tóxico de LPS (como 3dMPL).

25 Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se describen en el capítulo 7 de la referencia 169

El uso de adyuvantes de sal de aluminio es particularmente útil, y los antígenos generalmente se adsorben a tales sales. Los conjugados Menjugate<sup>TM</sup> y NeisVac<sup>TM</sup> usan un adyuvante de hidróxido, mientras que Meningitec<sup>TM</sup> usa un adyuvante de fosfato. Es posible en las composiciones de la divulgación adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio pero tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. Típicamente, sin embargo, solo se usa una sal, por ejemplo, un hidróxido o un fosfato, pero no ambos. No todos los conjugados necesitan ser adsorbidos, es decir, algunos o todos pueden estar libres en solución.

*Procedimientos de tratamiento*

35 La divulgación también proporciona un procedimiento para elevar una respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar una composición farmacéutica de la divulgación al mamífero. La respuesta inmune es preferiblemente protectora y preferiblemente involucra anticuerpos. El procedimiento puede generar una respuesta de refuerzo.

40 El mamífero es preferiblemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferiblemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferiblemente un adulto. Una vacuna destinada a niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, la dosis, la inmunogenicidad, etc. Una clase preferida de humanos para el tratamiento son los pacientes con riesgo de infección nosocomial, particularmente aquellos con enfermedad renal en etapa terminal y/o en hemodiálisis. También se prefieren otros pacientes con riesgo de infección nosocomial, por ejemplo, pacientes inmunodeficientes o aquellos que se han sometido a cirugía, especialmente cirugía cardíaca o trauma. Otra clase preferida de humanos para el tratamiento son los pacientes con riesgo de bacteremia.

45 La divulgación también proporciona una composición de la divulgación para su uso como medicamento. El medicamento es preferiblemente capaz de elevar una respuesta inmune en un mamífero (es decir, es una composición inmunogénica) y es más preferiblemente una vacuna.

La divulgación también proporciona el uso de un conjugado de la divulgación en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmune en un mamífero.

50 Estos usos y procedimientos son preferiblemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por *S. agalactiae*, por ejemplo, sepsis o bacteremia neonatal, neumonía neonatal, meningitis neonatal, endometritis, osteomielitis, artritis séptica, etc.

El sujeto en el que se previene la enfermedad puede no ser el mismo que el sujeto que recibe el conjugado de la divulgación. Por ejemplo, se puede administrar un conjugado a una mujer (antes o durante el embarazo) para proteger a la descendencia (la denominada "inmunización materna" [242-244]).

5 Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica controlar la infección por GBS después de la administración de la composición de la divulgación. Una forma de verificar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorear las respuestas inmunes contra los antígenos GBS después de la administración de la composición.

10 Las composiciones preferidas de la divulgación pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que sea superior al criterio de seroprotección para cada componente antigenico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpo asociado por encima del cual un huésped se considera seroconvertido contra el antígeno son bien conocidos, y tales títulos son publicados por organizaciones como la OMS. Preferiblemente, más del 80 % de una muestra estadísticamente significativa de sujetos es seroconvertida, más preferiblemente más del 90 %, aún más preferiblemente más del 93 % y lo más preferiblemente 96-100 %.

15 Las composiciones de la divulgación generalmente se administrarán directamente a un paciente. El suministro directo se puede realizar mediante inyección parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o al espacio intersticial de un tejido), o administración por vía rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra mucosa. Se prefiere la administración intramuscular al muslo o la parte superior del brazo. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero la inyección sin aguja puede usarse alternativamente. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

La divulgación puede usarse para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa.

20 20 El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. Se pueden usar dosis múltiples en un programa de vacunación primaria y/o en un programa de vacunación de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede ser seguido por un programa de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis de cebado (por ejemplo, entre 4 y 16 semanas), y entre el cebado y el refuerzo, se puede determinar de forma rutinaria.

#### General

25 25 La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura (por ejemplo, referencias 245-252, etc.).

30 30 El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y. En algunas implementaciones, el término "que comprende" se refiere a la inclusión del agente activo indicado, tal como polipéptidos recitados, así como la inclusión de otros agentes activos, y vehículos, excipientes, emolientes, estabilizadores, etc. farmacéuticamente aceptables, como se sabe en la industria farmacéutica. En algunas implementaciones, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a una composición, cuyo único ingrediente activo es el ingrediente o ingredientes activos indicados, sin embargo, se pueden incluir otros compuestos que son para estabilizar, preservar, etc. la formulación, pero están directamente involucrados en el efecto terapéutico del ingrediente activo indicado. El uso de la expresión de transición "que consiste esencialmente" significa que el alcance de una reivindicación debe interpretarse para abarcar los materiales o pasos especificados en la declaración, y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la divulgación reivindicada. Véase, *In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976); véase también MPEP § 2111,03. El término "que consiste esencialmente en" cuando se usa en una reivindicación de esta divulgación no pretende interpretarse como equivalente a "que comprende".

40 40 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

45 45 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la divulgación.

50 50 Cuando la divulgación proporciona un proceso que implica múltiples pasos secuenciales, la divulgación también puede proporcionar un proceso que implica menos del número total de pasos. Los diferentes pasos pueden ser realizados en diferentes momentos por diferentes personas en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

50 Se apreciará que los anillos de azúcar pueden existir en forma abierta y cerrada y que, aunque las formas cerradas se muestran en las fórmulas estructurales en el presente documento, las formas abiertas también están abarcadas por la divulgación. De manera similar, se apreciará que los azúcares pueden existir en formas de piranosa y furanosa y que, aunque las formas de piranosa se muestran en las fórmulas estructurales de la presente, también se abarcan las formas de furanosa. También se abarcan diferentes formas anoméricas de azúcares.

#### **Modos para realizar la divulgación**

A. Derivatización de sacáridos

Los sacáridos GBS serotipo II y V se hicieron reaccionar con NaIO<sub>4</sub> para efectuar la oxidación de los residuos de ácido siálico a grupos aldehído. El grado de oxidación de las unidades estructurales sialilo se controló variando la cantidad de NaIO<sub>4</sub> utilizada. La aminación reductora de los aldehídos proporcionó grupos amina para la inserción de diferentes espaciadores, facilitando la unión del grupo ciclooctino a los sacáridos. Se probaron diversos compuestos que contienen ciclooctino para establecer la longitud óptima para el espaciador, como se muestra en la Figura 1.

Las reacciones se monitorizaron mediante espectroscopía de RMN y las recuperaciones de carbohidratos se cuantificaron usando la determinación colorimétrica de ácido siálico. La Figura 2 muestra un esquema de reacción general para la unión de un grupo ciclooctino a un sacárido de serotipo II de GBS.

Usando este procedimiento, se produjeron dos derivativos de sacárido, como se muestra en la Figura 3 (sacárido GBS de serotipo V con grupo ciclooctino unido (I)) y en la Figura 4 (sacárido GBS de serotipo II con grupo ciclooctino unido (II)).

La cantidad de cada reactivo usado en la síntesis del sacárido del serotipo V de GBS con el grupo ciclooctino unido (I) fue la siguiente:

Compuestos	MW	mg	mmol NH <sub>2</sub>	eq	ml
GBS serotipo V sacárido-NH <sub>2</sub>	1323	30	0,00453		
Espaciador de éster de ciclooctino-N-hidroxisuccinimida	380	13		10	
Trietilamina					0,05
DMSO					3

15

La cantidad de cada reactivo usado en la síntesis del sacárido del serotipo II de GBS con el grupo ciclooctino unido (II) fue la siguiente:

Compuestos	MW	mg	mmol NH <sub>2</sub>	eq	ml
sacárido-NH <sub>2</sub> del serotipo II de GBS	1323	40	0,00393		
Espaciador de éster de ciclooctino-N-hidroxisuccinimida	380	13		10	
Trietilamina					0,04
DMSO					3

Se produjo un derivativo de sacárido adicional como se muestra en la Figura 10 (sacárido MenY con grupo ciclooctino unido (III)).

Los derivativos de sacárido también se sintetizaron usando los otros dos sistemas de cicloalquino mostrados en la Figura 1.

B. Producción y purificación de conjugados

Los espaciadores que permiten la conjugación de la proteína (GBS60 o GBS67) se instalaron mediante reacción de tipo Mannich dirigida al sitio sobre la tirosina usando los procedimientos descritos en PCT/US2012/045549, produciendo proteína transportadora unida a un grupo azida terminal. La proteína transportadora-azida se hizo reaccionar con el sacárido-ciclooctino para efectuar una reacción de cicloadición azida-alquino, produciendo conjugado de proteína transportadora-sacárido. La Figura 5 muestra un esquema de reacción general para la conjugación del derivativo de sacárido (II) a una proteína transportadora GBS80 a través de un residuo de tirosina.

Se sintetizaron ocho conjugados diferentes que contienen proteína GBS, como sigue (donde "Y" indica unión a la proteína transportadora GBS80 o GBS67 a través de un residuo de tirosina y "N<sub>3</sub>" denota el enlace triazol):

- A. GBS80-Y-N<sub>3</sub>-GBS sacárido de serotipo V
- B. GBS80-Y-N<sub>3</sub>-GBS sacárido de serotipo II
- 5 C. GBS67-Y-N<sub>3</sub>-GBS sacárido de serotipo II
- D. GBS67-Y-N<sub>3</sub>-GBS sacárido de serotipo V

La conjugación se realizó con una relación sacárido:proteína de 6:1 (p/p) para los conjugados A-B y con una relación sacárido: proteína de 4:1 (p/p) para los conjugados C-D. La adición de proteína (en PBS) a una concentración de 5 mg/ml al sacárido seguido de agitación a temperatura ambiente durante 6-12 horas produjo conjugados. Los conjugados se purificaron usando una columna de hidroxiapatita para eliminar la proteína libre (con un tampón de fase móvil NaPi 2 mM, pH 7,2 seguido de un tampón de fase móvil NaPi 400 mM, pH 7,2) y sacárido libre (con una fase móvil NaPi 2 mM, NaCl 550 mM, pH 7,2 tampón seguido de un tampón de fase móvil NaPi 10 mM, pH 7,2 seguido de un tampón de fase móvil NaPi 35 mM, pH 7,2 seguido de un tampón de fase móvil NaPi 400 mM, pH 7,2).

10 Se usó SDS-PAGE (3-8 %) para confirmar la formación de los conjugados. Los resultados de la caracterización SDS-PAGE para cada uno de los conjugados A-D se muestran en las Figuras 6-9, respectivamente.

15 El análisis HPAEC-PAD se usó para determinar el contenido de sacárido de los conjugados. Los conjugados tenían las siguientes propiedades:

Conjugado	Proteína	Sacárido/proteína (p/p)	Sacárido libre (%)	Proteína total (mg)	Sacárido/proteína utilizada para la conjugación (p/p)	Rendimiento (% de proteína final)
A	GBS80	2,2	<5,5	648,0	6:1	21,1
B	GBS80	2,7	<1,8	810,0	6:1	52,5
C	GBS67	1,1	<4,5	975,0	4:1	29,5
D	GBS67	2,5	<4,8	780,0	4:1	23,6

20 También se sintetizó un conjugado que contenía proteína CRM197. En particular, el derivativo de sacárido (III) se conjugó con la proteína CRM197, como sigue:

**E. CRM197-Y-N<sub>3</sub>-MenY sacárido**

La conjugación se llevó a cabo utilizando 60 equivalentes de derivativo de sacárido (2,1 mg) y 1,5 mg de proteína. Se usó SDS-PAGE para confirmar la formación del conjugado. Los resultados de la caracterización SDS-PAGE para el conjugado E se muestran en la Figura 11.

25 **C. Estudios de inmunización utilizando los conjugados**

La inmunogenicidad de diversos antígenos se probó en ratones como se describe a continuación.

*Modelo de desafío con cepa tipo V*

Se inmunizaron grupos de ocho ratones CD1 mediante inyección intraperitoneal con una dosis de 1,0 µg de sacárido en un volumen de inyección de 200 µl con AlumOH como adyuvante. Las inyecciones se llevaron a cabo a los 1, 21 y 35 días, con sangría ejecutada a los 1, 35 y 49 días. Las inmunizaciones se llevaron a cabo en grupos de ocho ratones con los siguientes antígenos: (i) PBS, (ii) sacárido CRM197-GBS serotipo V, (iii) sacárido TT-GBS serotipo V, (iv) sacárido de serotipo V GBS80-GBS y (v) sacárido de serotipo V GBS80-Y-N<sub>3</sub>-GBS (conjugado A). Los conjugados (i) a (iv) se prepararon usando metodologías de conjugación clásicas (por ejemplo, como se describe en la referencia [253]), mientras que el conjugado (v) se preparó usando química clic. Los neonatos fueron desafiados con cepas de tipo V. Los resultados se muestran a continuación:

Antígeno	Protección/tratado	% de Protección
PBS	19/40	47
sacárido CRM197-GBS serotipo V	61/70	87
sacárido TT-GBS serotipo V	-	-
sacárido GBS80-GBS serotipo V	54/57	95
sacárido <b>A</b> GBS80-Y-N <sub>3</sub> -GBS serotipo V	23/70	33

*Modelo de desafío con cepa tipo II*

Se inmunizaron grupos de ocho ratones CD1 mediante inyección intraperitoneal con una dosis de 1,0 µg de sacárido en un volumen de inyección de 200 µl con AlumOH como adyuvante. Las inyecciones se llevaron a cabo a los 1, 21 y 35 días, con sangrado a los 1, 35 y 49 días. Las inmunizaciones se llevaron a cabo en grupos de ocho ratones con los siguientes antígenos: (i) PBS, (ii) sacárido CRM197-GBS serotipo II, (iii) sacárido TT-GBS serotipo II, (iv) sacárido de serotipo II GBS80-GBS y (v) GBS80-Y-N<sub>3</sub>-GBS sacárido de serotipo II (conjugado **B**). Los conjugados (i) a (iv) se prepararon usando metodologías clásicas de conjugación, mientras que el conjugado (v) se preparó usando química clic. Los neonatos fueron desafiados con cepas de tipo II. Los resultados se muestran a continuación:

Antígeno	Protección/tratado	% de Protección
PBS	18/60	30
sacárido CRM197-GBS serotipo II	32/50	64
sacárido TT-GBS serotipo II	19/30	63
sacárido GBS80-GBS serotipo II	37/70	53
sacárido <b>B</b> GBS80-Y-N <sub>3</sub> -GBS serotipo II	58/65	89

10

Estos resultados muestran que se lograron niveles más altos de protección con el sacárido **B** del serotipo II GBS80-Y-N<sub>3</sub>-GBS que con los conjugados CRM197 y GBS80 obtenidos usando procedimientos de conjugación clásicos.

*Inmunoensayo ELISA para determinar títulos de IgG contra antígenos de sacárido de serotipo II GBS*

Los títulos de IgG contra el sacárido del serotipo II de GBS en los sueros de animales inmunizados se midieron como sigue. Las placas de microtitulación se revistieron con antígenos (por ejemplo, sacárido **B** del serotipo II GBS80-Y-N<sub>3</sub>-GBS) y las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y luego se lavaron tres veces en tampón de lavado (Tween 20 al 0,05 % en PBS). Despues de dispensar 250 µl de PBS, BSA al 2 %, Tween 20 al 0,05 % por pozo, las placas se incubaron 90 minutos a 37°C y luego 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 suero

20 estandar agrupando sueros hiperinmunes y se eligieron las diluciones iniciales de los grupos estandar para obtener una densidad óptica (DO) de aproximadamente 2000 a 405 nm. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y luego se lavaron con tampón de lavado y se dispensaron en cada pozo 100 µl de IgG anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina 1:1000 en tampón de dilución. Las placas se incubaron 90 minutos a 37°C y luego se lavaron con tampón de lavado. Se dispensaron 100 µl de una solución de fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP) 4,0 mg/ml en tampón de sustrato en cada pozo. Las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y luego se añadieron a cada pozo

25 100 µl de una solución de sal disódica con EDTA al 7 % (p/v) más Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 3,5 % pH 8,0 para detener la reacción enzimática. Se midió la densidad óptica (OD) a 405 nm. Los títulos de IgG totales contra el antígeno sacárido del serotipo II de GBS se calcularon utilizando el procedimiento de ensayo de línea de referencia y los resultados se expresaron como unidades ELISA arbitrarias/ml (EU/ml). Para cada uno de los tres antígenos, al título estandar de

IgG en suero se le asignó arbitrariamente un valor de 1,0 EU/mL. El título de IgG de cada suero se estimó interpolando las OD obtenidas con la curva de titulación (desviación y pendiente) del conjunto estándar.

Los resultados se muestran en la Figura 12 (para una dosis de 1,0 µg de carbohidratos), la Figura 13 (para una dosis de 0,5 µg de carbohidratos) y la Figura 14 (para una dosis de proteína de 1,0 µg). A 1,0 µg de dosis de carbohidrato, los títulos de IgG de sacárido **B** de serotipo II GBS80-Y-N<sub>3</sub>-GBS no son estadísticamente diferentes de los conjugados CRM197 y GBS80 obtenidos usando procedimientos de conjugación clásicos. A 0,5 µg de dosis de carbohidrato, los títulos de IgG de sacárido **B** de GBS80-Y-N<sub>3</sub>-GBS serotipo II no son estadísticamente diferentes de todos los nuevos conjugados y control.

*Ensayo de opsonofagocitosis*

El ensayo de opsonofagocitosis se realizó usando cepas de GBS como células diana y línea celular HL-60 (ATCC; CCL-240), diferenciadas en células similares a granulocitos, mediante la adición de 100 mM de N,N dimetilformamida (Sigma) al medio de crecimiento por 4 días. Las células bacterianas exponenciales medias se incubaron a 37°C durante 1 h en presencia de células fagocíticas, 10 % de complemento de conejo bebé (Cedarlane) y antisueros de ratón inactivados por calor. Los controles negativos consistieron en reacciones con sueros preinmunes, o sin HL-60, o con complemento inactivado por calor. La cantidad de muerte opsonofagocítica se determinó restando el registro del número de colonias que sobrevivieron al ensayo de 1 h del registro del número de UFC en el punto de tiempo cero. Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 15 y a continuación:

Antígeno	Títulos de OPKA
PBS	10
sacárido CRM197-GBS serotipo II	2306
sacárido GBS80-GBS serotipo II	2443
sacárido <b>B</b> GBS80-Y-N <sub>3</sub> -GBS serotipo II	1415

Los títulos de GBS80-Y-N<sub>3</sub>-GBS serotipo II sacárido **B** OPKA e IgG son estadísticamente comparables a los conjugados CRM197 y GBS80 obtenidos usando procedimientos de conjugación clásicos. Los títulos de OPKA e IgG muestran una buena correlación con el % de supervivencia en el modelo animal de desafío.

*Inmunogenicidad de conjugados preparados en diferentes relaciones sacárido:proteína*

La respuesta inmune se evaluó frente a sacárido GBS de serotipo II con una dosis de proteína de 1,0 µg) con conjugados que tienen diferentes proporciones de sacárido:proteína. Los resultados se muestran en la Figura 16 y a continuación:

Antígeno	Relación PS/proteína (p/p)	Protección/tratada (cepa de desafío DK21)	% de Protección
PBS		6/59	10
sacárido GBS80, GBS serotipo II		42/79	53

(continuación)

Antígeno	Relación PS/proteína (p/p)	Protección/tratada (cepa de desafío DK21)	% de Protección
sacárido GBS80-GBS serotipo II	1,8	36/60	60

sacárido GBS80-Y-N <sub>3</sub> -GBS serotipo II	2,7	32/80	40
sacárido GBS80-Y-N <sub>3</sub> -GBS serotipo II	1,1	68/69	98

La respuesta inmune también se evaluó frente a GBS80 (con una dosis de proteína de 1,0 µg) con conjugados que tienen diferentes proporciones de sacárido:proteína. Los resultados se muestran en la Figura 17 y a continuación:

Antígeno	Relación PS/proteína (p/p)	Protección/tratada (cepa de desafío DK21)	% de Protección
PBS		28/80	35
GBS80		35/60	58
sacárido GBS80, GBS serotipo II		37/50	74
sacárido GBS80-GBS serotipo II	1,8	30/60	50
sacárido GBS80-Y-N <sub>3</sub> -GBS serotipo II	2,7	36/80	45
sacárido GBS80-Y-N <sub>3</sub> -GBS serotipo II	1,1	49/70	70

## 5 Evaluación de la presencia de anticuerpos antienlazadores

Se preparó una construcción mediante conjugación selectiva de tirosina de un dímero MenY a CRM197 (Figura 18). Se encontraron bajos niveles de anticuerpos dirigidos al enlazador.

## Referencias

- [1] Peptide Science (2010), 94(1), 95.
- 10 [2] Kolb et al., (2004) Angew Chem Int Ed 40, 3004
- [3] Evans (2007) Aust J Chem 60, 384.
- [4] Tornoe et al. (2002) J Organic Chem 67, 3057
- [5] Rostovstev et al., (2002) Angew Chem Int Ed 41, 2596
- [6] Agard et al., (2004) J Am Chem Soc 126, 15046
- 15 [7] Pure Appl. Chem. (1984), 56, 893.
- [8] Nature Reviews (2006) 4, 509.
- [9] WO2006/050341
- [10] Guttormsen et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA. 105(15):5903-8. Epub 2008 Mar 31.
- [11] WO96/40795
- 20 [12] Michon et al. (2006) Clin Vaccine Immunol. 2006 Aug;13(8):936-43.
- [13] Lewis et al. (2004) PNAS USA 101:11123-8.

- [14] Wessels et al. (1989) *Infect Immun* 57:1089-94.
- [15] WO2006/082527.
- [16] WO2009/081276.
- [17] Ravenscroft et al. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- 5 [18] Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [19] WO02/058737.
- [20] Frash (1990) p.123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [21] WO03/007985.
- [22] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- 10 [23] WO200/5103230
- [24] Kandil et al. (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
- [25] Berkin et al. (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
- [26] Glode et al. (1979) *J Infect Dis* 139:52-56
- [27] WO94/05325; US patent 5,425,946.
- 15 [28] WO2005/033148.
- [29] WO03/080678.
- [30] WO2008/084411
- [31] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296)
- [32] Tokunaka et al. (1999) *Carbohydr Res* 316:161-172.
- 20 [33] WO03/097091
- [34] Pang et al. (2005) *Biosci Biotechnol Biochem* 69:553-8.
- [35] Read et al. (1996) *Carbohydr Res.* 281:187-201.
- [36] Takeo and Tei (1986) *Carbohydr Res.* 145:293-306
- [37] Tanaka et al. (2003) *Tetrahedron Letters* 44:3053-3057
- 25 [38] Ning et al. (2002) *Tetrahedron Letters* 43:5545-5549
- [39] Geurtsen et al. (1999) *Journal of Organic Chemistry* 64 (21):7828-7835
- [40] Wu et al. (2003) *Carbohydr Res.* 338:2203-12
- [41] Nicolaou et al. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119:449-450
- [42] Yamada et al. (1999) *Tetrahedron Letters* 40:4581-4584
- 30 [43] Yamago et al. (2001) *Org. Lett.* 24:3867-3870
- [44] Yuguo et al. (2004) *Tetrahedron* 60: 6345-6351
- [45] Amaya et al. (2001) *Tetrahedron Letters* 42:9191-9194
- [46] Mei et al. (2005) *Carbohydr Res.* 340:2345-2351
- [47] Takeo et al. (1993) *Carbohydr Res.* 245:81-96
- 35 [48] Jamois et al. (2005) *Glycobiology* 15(4):393-407
- [49] Lefeber et al. (2001) *Chem. Eur. J.* 7(20):4411-4421
- [50] Huang et al. (2005) *Carbohydr Res.* 340:603-608

- [51] US patent 5508191.
- [52] MiKyung et al. (2003) Biochemical Engineering Journal, 16:163-8.
- [53] Barsanti et al. (2001) J Appl Phycol 13:59-65.
- [54] Bardotti et al. (2008) Vaccine 26:2284-96
- 5 [55] Jones (2005) An. Acad. Bras. Cienc, 77(2) 293-324.
- [56] Jones (2005) J Pharm Biomed Anal 38 840-850.
- [57] Moreau et al. (1990) Carbohydrate Res. 339(5):285-91
- [58] Fournier et al. (1984) Infect. Immun. 45(1):87-93.
- [59] Jones (2005) Carbohydrate Res. 340(6):1097-106.
- 10 [60] Fattom et al. (1998) Infect Immun. 66(10):4588-92
- [61] Lemercinier and Jones (1996) Carbohydrate Res. 296:83-96.
- [62] Jones and Lemercinier (2002) J Pharm Biomed Anal. 30(4): 1233-47.
- [63] WO05/033148
- [64] WO 00/56357
- 15 [65] Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180:249-261.
- [66] Konadu et al. (1994) Infect. Immun. 62:5048-5054.
- [67] Fattom et al. (1990) Infect Immun. 58(7):2367-74
- [68] Gilbert et al. (1994) J. Microb. Meth. 20:39-46.
- [69] Kreis et al. (1995) Int J Biol Macromol. 17(3-4):117-30.
- 20 [70] Höög et al. (2002) Carbohydr Res. 337(21-23):2023-36
- [71] www.polymer.de
- [72] US patent 4356170.
- [73] US patents 4,356,170 and 4,663,160
- [74] US patent 4711779.
- 25 [75] WO00/10599.
- [76] US patent 4,057,685.
- [77] WO2012/075361.
- [78] Wan et al. (2006) J Org Chem, 71, 8244
- [79] WO2005/000346
- 30 [80] Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.
- [81] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- [82] Anderson et al. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- [83] EP-A-0372501[84] EP-A-0378881.
- [85] EP-A-0427347.
- 35 [86] WO93/17712
- [87] WO94/03208.
- [88] WO98/58668.

- [89] EP-A-0471177.
- [90] WO91/01146
- [91] Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-24.
- [92] Baraldo et al. (2004) *Infect Immun* 72:4884-87.
- 5 [93] EP-A-0594610.
- [94] WO00/56360.
- [95] WO02/091998.
- [96] Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [97] WO01/72337
- 10 [98] WO00/61761.
- [99] WO00/33882.
- [100] WO2004/041157.
- [101] WO 2012/035519
- [102] WO96/40242.
- 15 [103] Lei et al. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- [104] WO00/38711
- [105] WO99/24578.
- [106] WO99/36544.
- [107] WO99/57280.
- 20 [108] WO00/22430.
- [109] Tettelin et al. (2000) *Science*, 287, 1809.
- [110] WO96/29412.
- [111] Pizza et al. (2000) *Science*, 287, 1816.
- [112] WO01/52885.
- 25 [113] Bjune et al. (1991) *Lancet*, 338, 1093.
- [114] Fukasawa et al. (1999) *Vaccine*, 17, 2951.
- [115] Rosenqvist et al. (1998) *Dev. Biol. Stand.*, 92, 323.
- [116] Costantino et al. (1992) *Vaccine*, 10, 691.
- [117] WO03/007985.
- 30 [118] Watson (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 19, 331.
- [119] Rubin (2000) *Pediatr. Clin. North. Am.*, 47, 269.
- [120] Jedrzejas (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 187.
- [121] Bell (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 19, 1187.
- [122] Iwarson (1995) *APMIS*, 103, 321.
- 35 [123] Gerlich et al. (1990) *Vaccine*, 8, S63-68 & 79-80.
- [124] Hsu et al. (1999) *Clin. Liver. Dis.*, 3, 901.
- [125] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.*, 334, 349.

- [126] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH, 9, 232.
- [127] Vaccines (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
- [128] WO02/02606.
- [129] Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
- 5 [130] Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
- [131] Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3):S524-S527.
- [132] WO99/27105.
- [133] WO00/27994.
- [134] WO00/37494.
- 10 [135] WO99/28475.
- [136] Ross et al. (2001) Vaccine, 19, 4135.
- [137] Sutter et al. (2000) Pediatr. Clin. North. Am., 47, 287.
- [138] Zimmerman & Spann (1999) Am. Fam. Physician., 59, 113-118, 125-126.
- [139] Dreesen (1997) Vaccine, 15 Suppl, S2.
- 15 [140] MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. (1998), 47, 12, 19.
- [141] McMichael (2000) Vaccine, 19 Suppl 1, S101.
- [142] WO02/34771.
- [143] Dale (1999) Infect. Dis. Clin. North. Am., 13, 227, viii.
- [144] Ferretti et al. (2001) PNAS USA, 98, 4658.
- 20 [145] WO03/093306.
- [146] WO2004/018646.
- [147] WO2004/041157.
- [148] Ichiman and Yoshida (1981) J. Appl. Bacteriol., 51, 229.
- [149] US4197290
- 25 [150] Ichiman et al. (1991) J. Appl. Bacteriol., 71, 176.
- [151] Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunology, 9, 271.
- [152] Donnelly et al. (1997) Annu. Rev. Immunol., 15, 617.
- [153] Scott-Taylor & Dagleish (2000) Expert. Opin. Investig. Drugs, 9, 471.
- [154] Apostolopoulos & Plebanski (2000) Curr. Opin. Mol. Ther., 2, 441.
- 30 [155] Ilan (1999) Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 116.
- [156] Dubensky et al. (2000) Mol. Med., 6, 723.
- [157] Robinson & Pertmer (2000) Adv. Virus Res., 55, 1.
- [158] Donnelly et al. (2000) Am. J. Respir. Crit. Care Med., 162, S190.
- [159] Davis (1999) Mt. Sinai J. Med., 66, 84.
- 35 [160] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition.
- [161] WO03/009869.
- [162] Almeida & Alpar (1996) J. Drug Targeting, 3, 455.

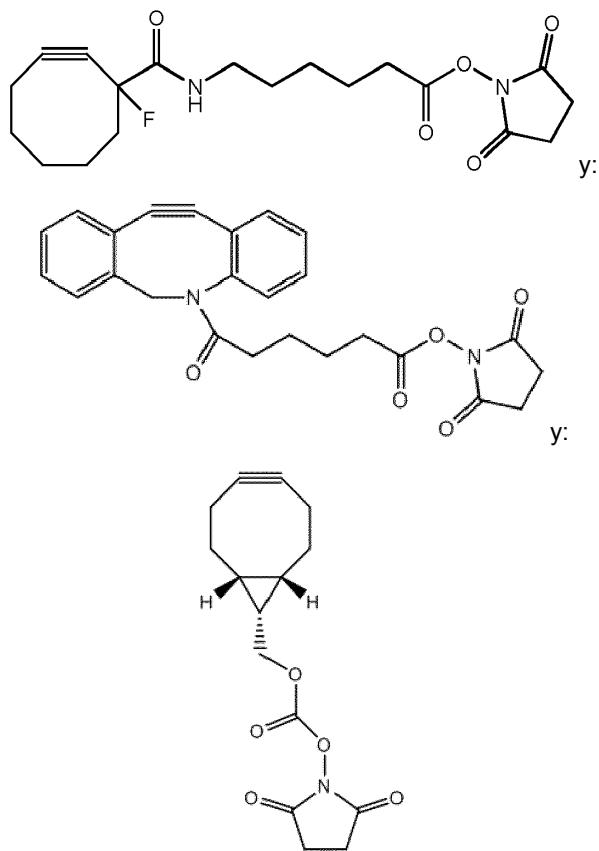
- [163] Agarwal & Mishra (1999) Indian J. Exp. Biol., 37, 6.
- [164] WO00/53221.
- [165] Jakobsen et al. (2002) Infect. Immun., 70, 1443.
- [166] Bergquist et al. (1998) APMIS, 106, 800.
- 5 [167] Baudner et al. (2002) Infect. Immun., 70, 4785.
- [168] Uguzzoli et al. (2002) J. Infect. Dis., 186, 1358.
- [169] Vaccine Design (1995) Powell & Newman, Plenum.
- [170] WO00/23105.
- [171] WO90/14837.
- 10 [172] Podda (2001) Vaccine, 19, 2673.
- [173] Frey et al. (2003) Vaccine, 21, 4234.
- [174] US Patent 6,299,884.
- [175] US Patent 6,451,325.
- [176] US patent 5,057,540.
- 15 [177] WO96/33739.
- [178] EP-A-0109942.
- [179] WO96/11711.
- [180] WO00/07621.
- [181] Barr et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews, 32, 247.
- 20 [182] Sjolanderet et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews, 32, 321.
- [183] Niikura et al. (2002) Virology, 293, 273.
- [184] Lenz et al. (2001) J. Immunol., 166, 5346.
- [185] Pinto et al. (2003) J. Infect. Dis., 188, 327.
- [186] Gerber et al. (2001) Virol., 75, 4752.
- 25 [187] WO03/024480.
- [188] WO03/024481.
- [189] Gluck et al. (2002) Vaccine, 20, B10.
- [190] EP-A-0689454.
- [191] Johnson et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 2273.
- 30 [192] Evans et al. (2003) Expert Rev. Vaccines, 2, 219.
- [193] Meraldi et al. (2003) Vaccine, 21, 2485.
- [194] Pajak et al. (2003) Vaccine, 21, 836.
- [195] Kandimalla et al. (2003) Nucleic Acids Research, 31, 2393.
- [196] WO02/26757.
- 35 [197] WO99/62923.
- [198] Krieg (2003) Nature Medicine, 9, 831.
- [199] McCluskie et al. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology, 32, 179.

- [200] WO98/40100.
- [201] US patent 6,207,646.
- [202] US patent 6,239,116.
- [203] US patent 6,429,199.
- 5 [204] Kandimalla et al. (2003) Biochemical Society Transactions, 31, 654.
- [205] Blackwell et al. (2003) J. Immunol., 170, 4061.
- [206] Krieg (2002) Trends Immunol., 23, 64.
- [207] WO01/95935.
- [208] Kandimalla et al. (2003) BBRC, 306, 948.
- 10 [209] Bhagat et al. (2003) BBRC, 300, 853.
- [210] WO03/035836.
- [211] WO95/17211.
- [212] WO98/42375.
- [213] Beignon et al. (2002) Infect. Immun., 70, 3012.
- 15 [214] Pizza et al. (2001) Vaccine, 19, 2534.
- [215] Pizza et al. (2000) Int. J. Med. Microbiol., 290, 455.
- [216] Scharton-Kersten et al. (2000) Infect. Immun., 68, 5306.
- [217] Ryan et al. (1999) Infect. Immun., 67, 6270.
- [218] Partidos et al. (1999) Immunol. Lett., 67, 209.
- 20 [219] Peppoloni et al. (2003) Expert. Rev. Vaccines, 2, 285.
- [220] Pine et al. (2002) J. Control. Release., 85, 263.
- [221] Domenighini et al. (1995) Mol. Microbiol., 15, 1165.
- [222] WO99/40936.
- [223] WO99/44636.
- 25 [224] Singh et al. (2001) J Cont. Release., 70, 267.
- [225] WO99/27960.
- [226] US patent 6,090,406.
- [227] US patent 5,916,588.
- [228] EP-A-0626169.
- 30 [229] WO99/52549.
- [230] WO01/21207.
- [231] WO01/21152.
- [232] Andrianov et al. (1998) Biomaterials, 19, 109.
- [233] Payne et al. (1998) Adv. Drug Delivery Review, 31, 185.
- 35 [234] Stanley (2002) Clin. Exp. Dermatol., 27, 571.
- [235] Jones (2003) Curr. Opin. Investig. Drugs, 4, 214.
- [236] WO04/60308.

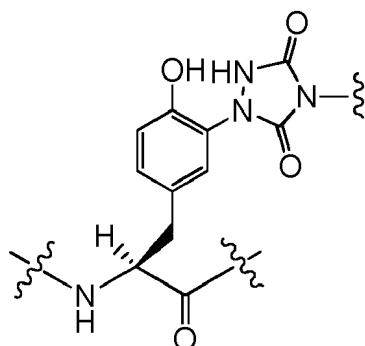
- [237] WO04/64759.
- [238] WO99/11241.
- [239] WO94/00153.
- [240] WO98/57659.
- 5 [241] European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231.
- [242] Glezen & Alpers (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28:219-224
- [243] Madoff et al. (1994) *J Clin Invest* 94:286-92.
- [244] Paoletti et al. (1994) *Infect Immun* 62:3236-43.
- [245] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition.
- 10 [246] Colowick & Kaplan, Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.
- [247] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications).
- [248] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 15 [249] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997).
- [250] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols).
- [251] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press)
- [252] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- 20 [253] WO2012/035519

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de derivatización de un sacárido que comprende unir un grupo cicloalquino de ocho miembros al sacárido, en el que el sacárido es un sacárido capsular.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sacárido es un sacárido capsular GBS.
- 5 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el grupo cicloalquino de ocho miembros se fusiona a un grupo ciclopropano, o en el que el grupo cicloalquino de ocho miembros se fusiona a dos grupos benceno, o en el que el grupo cicloalquino de ocho miembros es un grupo ciclooctino.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el grupo cicloalquino de ocho miembros está unido al sacárido a través de un espaciador.
- 10 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la unión se lleva a cabo usando un compuesto que tiene la fórmula  $X_1-L-X_2$ , en el que el compuesto que tiene la fórmula  $X_1-L-X_2$  se selecciona del grupo que consiste en:



- 15 6. Un derivativo de sacárido que comprende un grupo cicloalquino de ocho miembros, en el que el grupo cicloalquino de ocho miembros es un grupo ciclooctino y en el que el derivativo de sacárido se puede obtener por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un procedimiento para conjugar un derivativo de sacárido de acuerdo con la reivindicación 6 a una fracción que contiene azida, que comprende hacer reaccionar el grupo cicloalquino de ocho miembros con la azida para formar un enlace triazol, en el que la fracción que contiene azida es una proteína.
- 20 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la conjugación se produce mediante una reacción de cicloadición [3+2].
9. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que la fracción que contiene azida incluye un espaciador.
- 25 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la fracción que contiene azida es una proteína transportadora que contiene al menos un residuo de tirosina derivatizado que tiene la siguiente estructura, en la que la azida se une a través del 3H-1,2,4-triazol-3,5(4H)-diona:



- 5 11. Un conjugado de un derivativo de sacárido de acuerdo con la reivindicación 6 y una fracción que contiene azida, en el que el conjugado tiene la fórmula R-S-T, en la que R comprende un residuo del derivativo de sacárido, S es un grupo triazol fusionado a un grupo cicloalquilo de ocho miembros y T comprende un residuo de la fracción que contiene azida.
12. El conjugado de la reivindicación 11, en el que el conjugado incluye un espaciador en el residuo del derivativo de sacárido entre el sacárido y S y en el que el espaciador tiene la fórmula  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ , donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.
- 10 13. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en el que el conjugado incluye un espaciador en el residuo de la fracción que contiene azida entre la fracción y S, y en el que el espaciador tiene la fórmula  $-\text{[(CH}_2)_2\text{O]}_n-$ , donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.
14. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el conjugado incluye un espaciador en el residuo del derivativo de sacárido entre el sacárido y S y un espaciador en el residuo de la fracción que contiene azida entre la fracción y S.
- 15 15. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, obtenible por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
16. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 17. El conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16 para su uso en un procedimiento para elevar una respuesta inmune en un mamífero, que comprende administrar el conjugado o la composición farmacéutica al mamífero.

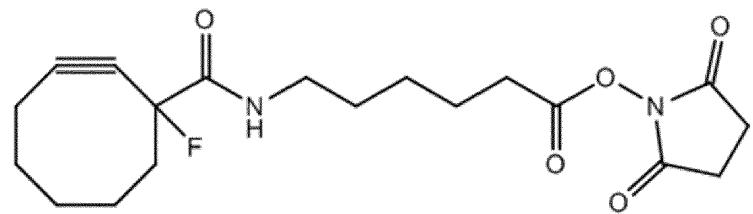
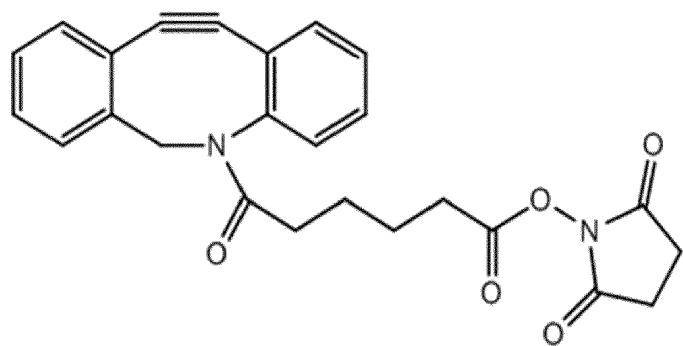
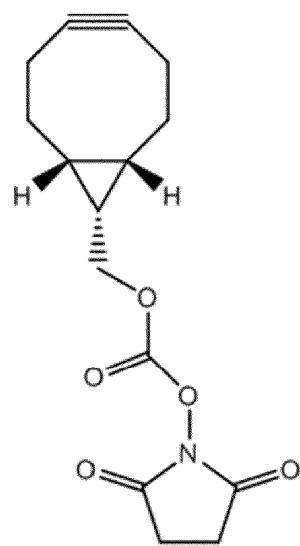


Fig. 1

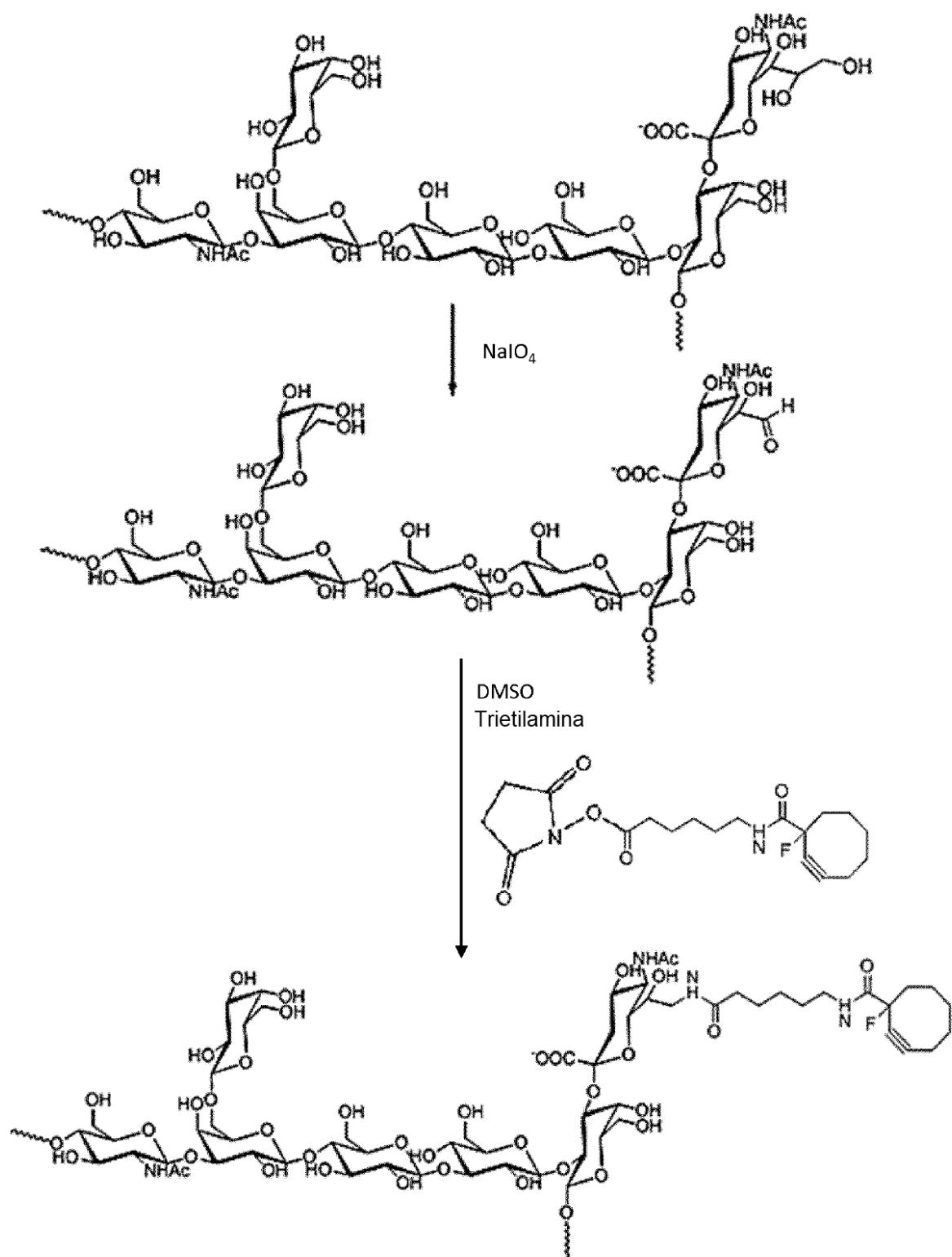


Fig. 2

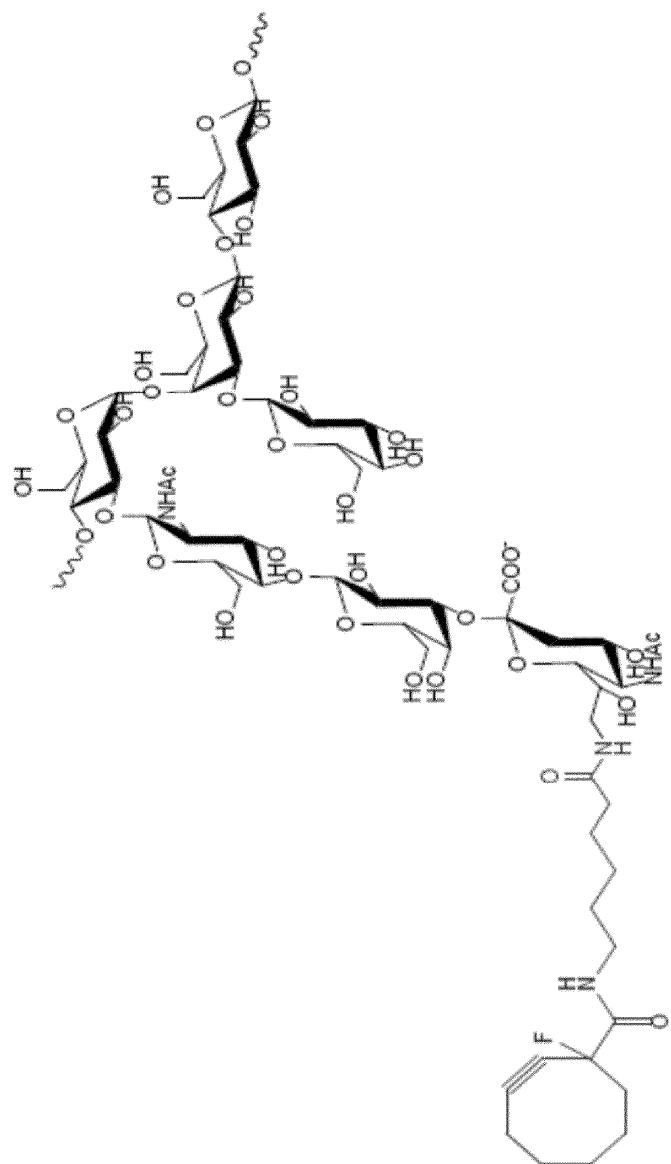


Fig. 3

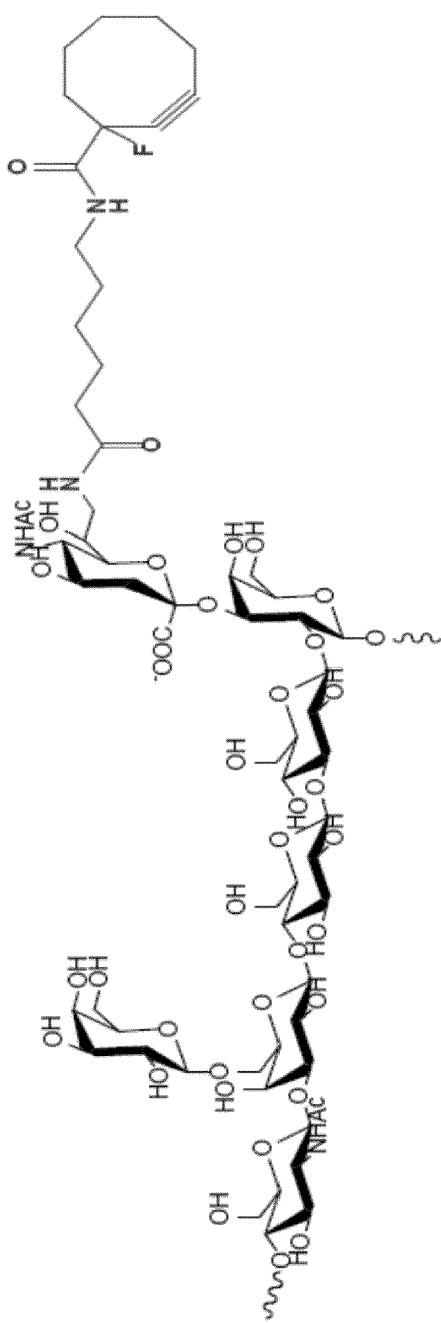


Fig. 4

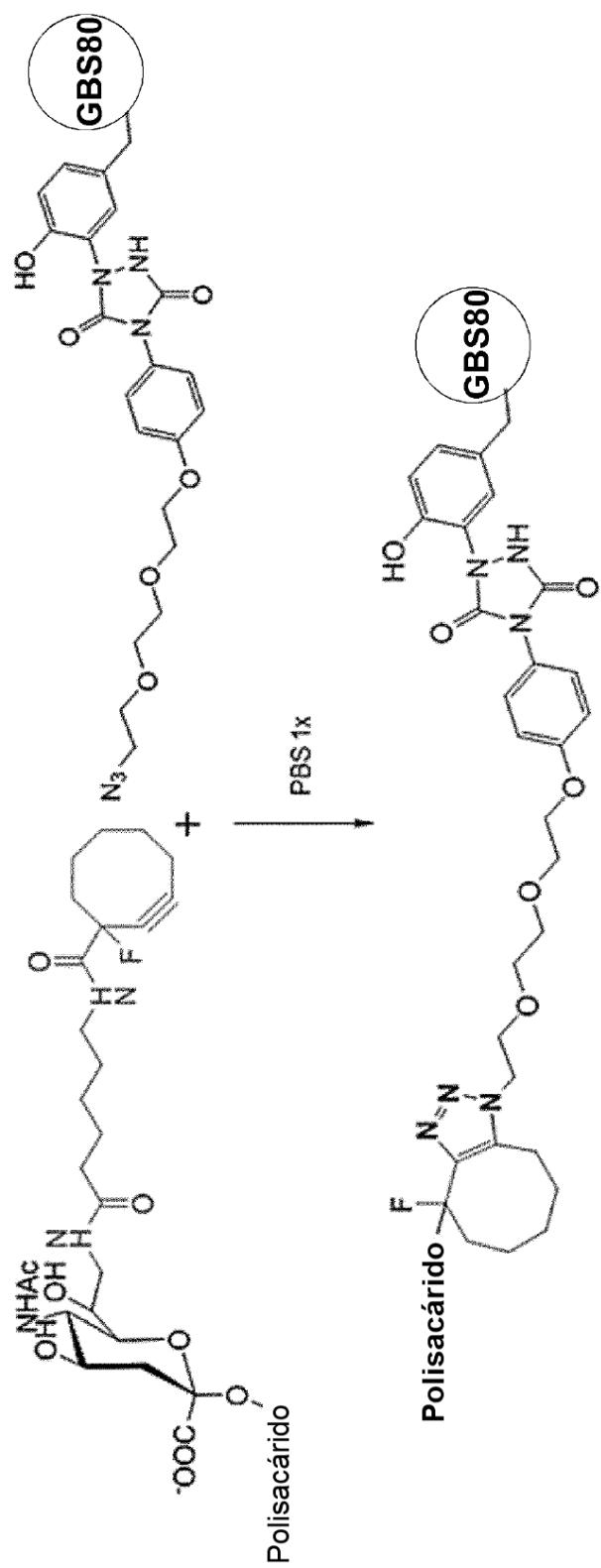


Fig. 5

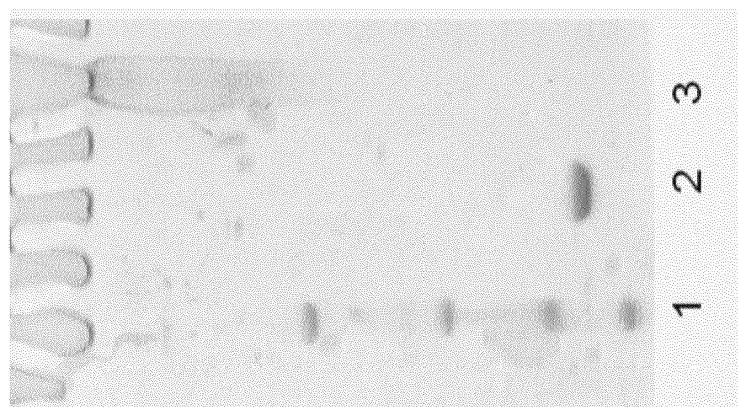


Fig. 7

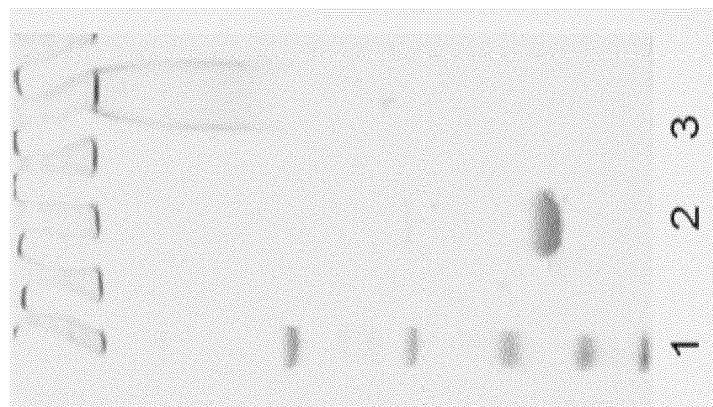


Fig. 6

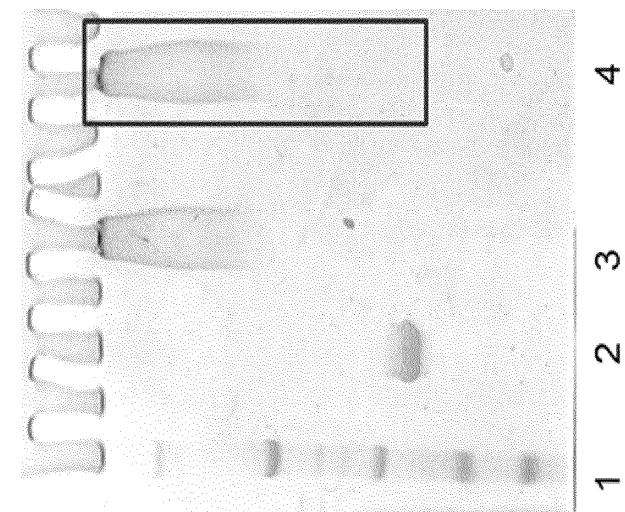


Fig. 9

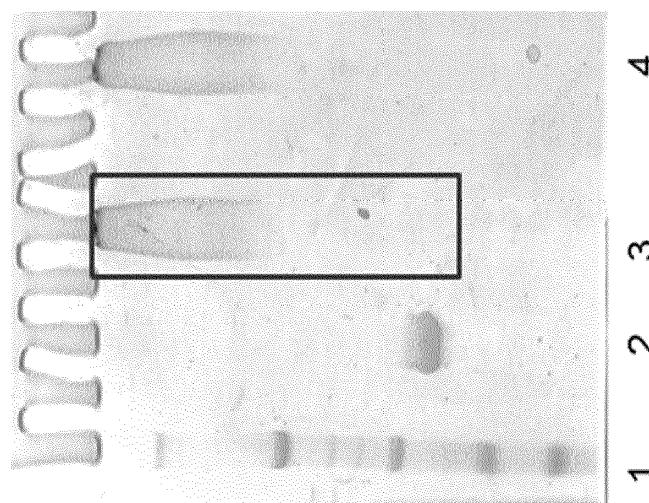


Fig. 8

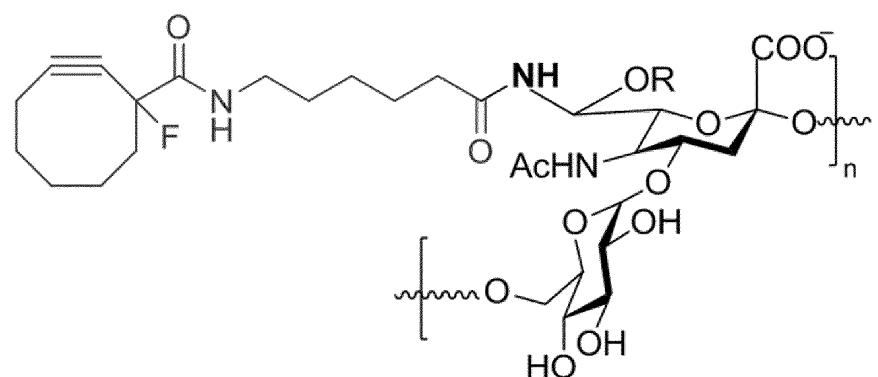


Fig. 10

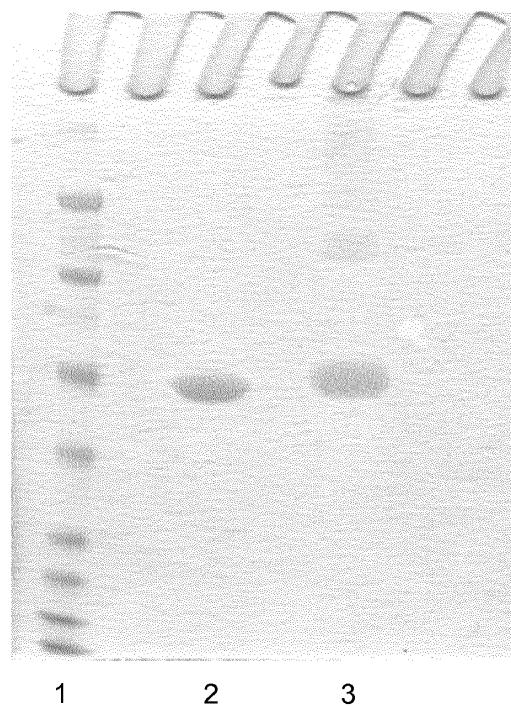


Fig. 11

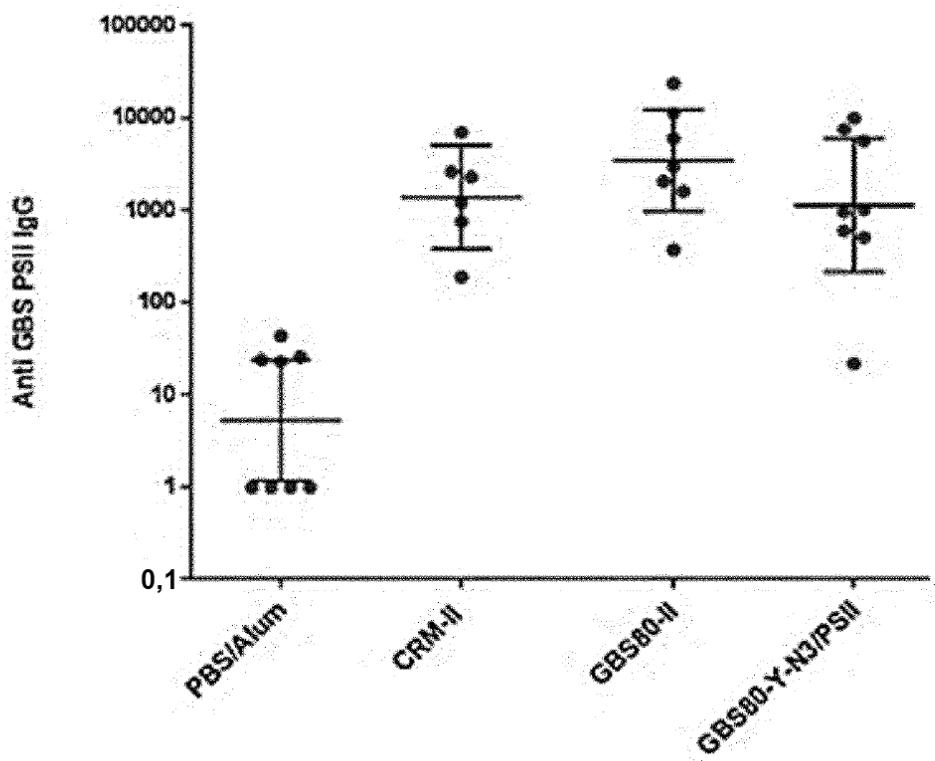


Fig. 12

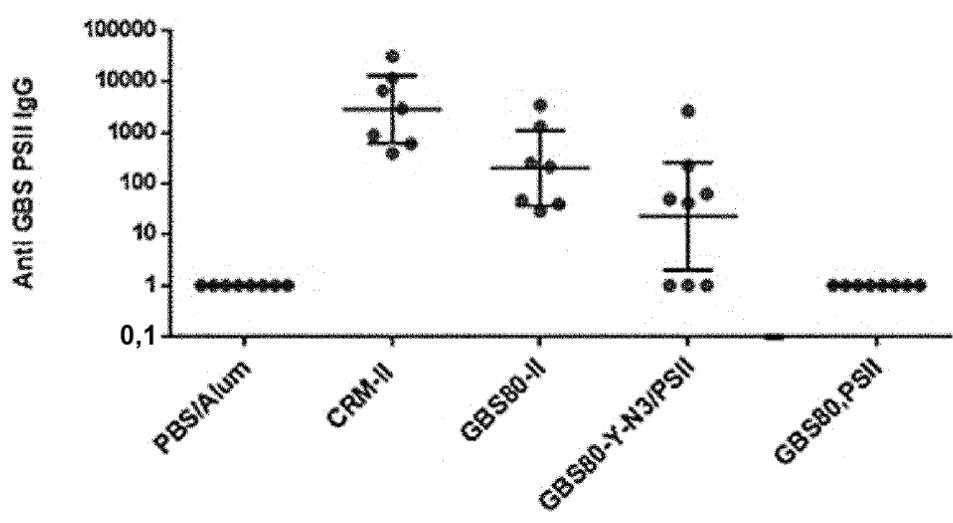


Fig. 13

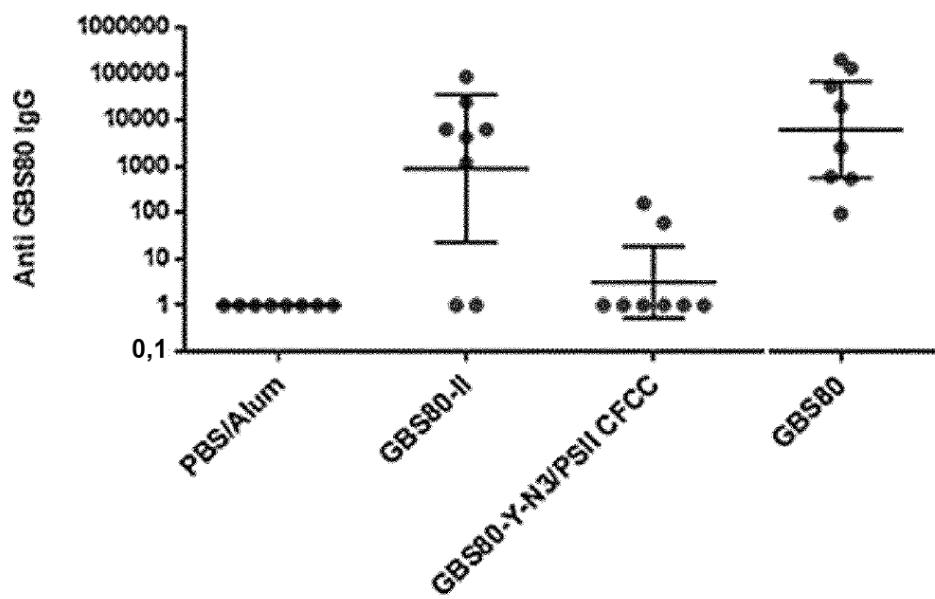


Fig. 14

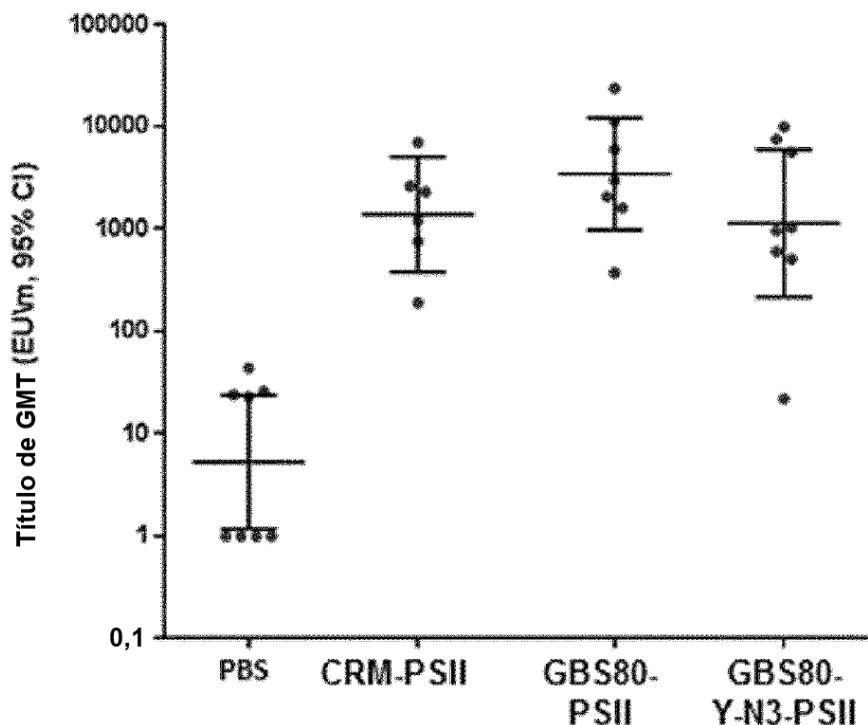


Fig. 15

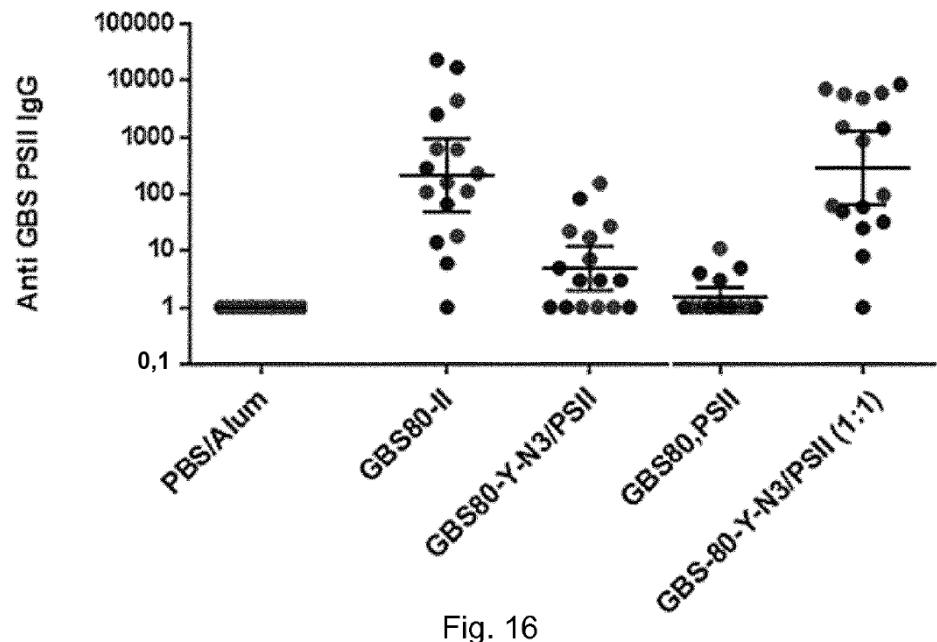


Fig. 16

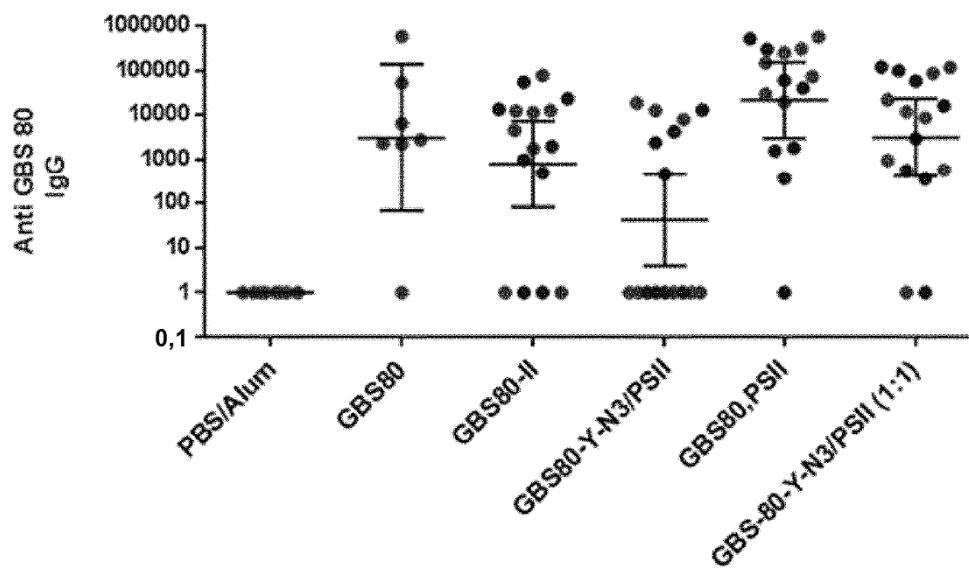


Fig. 17

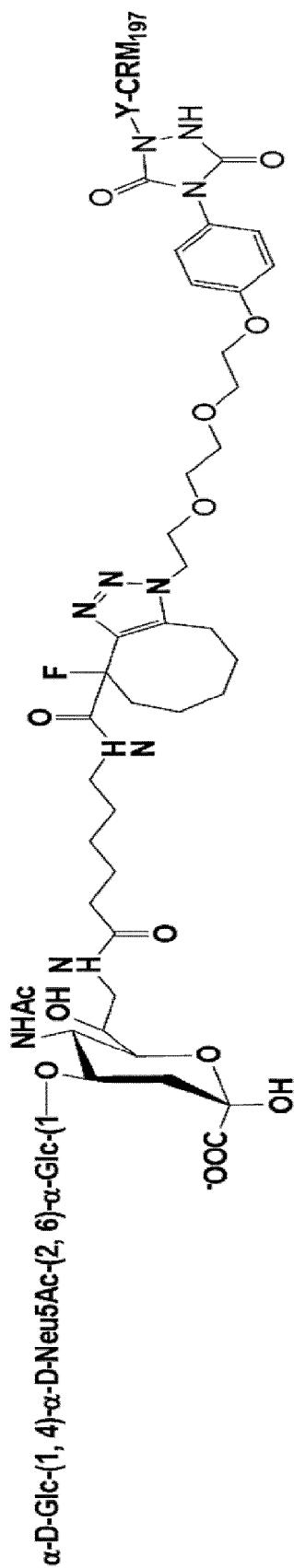


Fig. 18