



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 603 03 961 T2 2006.10.26

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 534 342 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 603 03 961.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/IB03/04194

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 791 149.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2004/019992

(86) PCT-Anmeldetag: 01.09.2003

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 11.03.2004

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 01.06.2005

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 08.03.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 26.10.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 47/48 (2006.01)

C07H 13/12 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0220198 30.08.2002 GB

(73) Patentinhaber:

Chiron S.r.l., Siena, IT

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR

(72) Erfinder:

GIANNOZZI, Aldo, I-53100 Siena, IT; AVERANI,  
Giovanni, I-53100 Siena, IT; NORELLI, Francesco,  
I-53100 Siena, IT; COSTANTINO, Paolo, I-53100  
Siena, IT

(54) Bezeichnung: MODIFIZIERTE SACCHARIDE, DEREN KONJUGATE SOWIE DEREN HERSTELLUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****FACHGEBIET**

**[0001]** Die Erfindung betrifft das Gebiet der Saccharidchemie und betrifft modifizierte Saccharide, Verfahren zu deren Herstellung und konjugierte Derivate. Im Besonderen betrifft sie modifizierte Saccharide mit einer Linkereinheit, die verwendet werden kann, um das Saccharid mit einem Protein zu verbinden.

**FACHLICHER HINTERGRUND**

**[0002]** Polysaccharide sind wichtige biologische Moleküle und sie sind in der pharmazeutischen Industrie häufig zur Vorbeugung und Behandlung von Krankheiten verwendet worden. Beispielsweise sind Kapselpolysaccharide viele Jahre lang in Impfstoffen gegen verkapselfte Bakterien, wie z.B. Meningococcus (*Neisseria meningitidis*), Pneumococcus (*Streptococcus pneumoniae*) und Hib (*Haemophilus influenzae* Typ B), verwendet worden.

**[0003]** Um die Immunogenität dieser Polysaccharide zu erhöhen, besonders bei Kindern, wurden konjugierte Impfstoffe entwickelt. Diese umfassen ein Kapselpolysaccharid, das mit einem Trägerprotein konjugiert ist [z.B. US-Patente 4,711,779, 4,761,283 und 4,882,317]. Das konjugierte Molekül kann das Polysaccharid und das Protein direkt verbunden aufweisen oder das Polysaccharid und das Protein können über eine Linkereinheit verbunden sein.

**[0004]** Obwohl voneinander verschiedene Arten von Linkereinheiten entwickelt worden sind, besteht Bedarf für neue Arten von Linkern, die vielseitig verwendbar sind und die unter Verwendung von einfacher, zuverlässiger Chemie an das Polysaccharid und das Protein gekuppelt werden können. Es besteht weiterer Bedarf für neue Linker, die ungiftig sind und die unter milden Bedingungen gebildet werden können, wobei die Verwendung scharfer Reagenzien, wie z.B. starke Säuren und Basen, vermieden wird.

**OFFENBARUNG DER ERFINDUNG****Erfindungsgemäße modifizierte Saccharide**

**[0005]** Die Erfindung stellt ein modifiziertes Kapselsaccharid bereit, das eine Einheit der Formel (I):



umfasst,

wobei:

A eine Bindung, -C(O)- oder -OC(O)- ist;

R<sup>1</sup> ausgewählt ist aus H oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl;

L ein C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkylenrest ist;

M ein maskierter Aldehydrest ist.

**[0006]** Der Begriff „modifiziertes Kapselsaccharid“ bedeutet ein Saccharid, das aus einem nativen Kapselsaccharid durch geeignete Modifikation erhältlich ist. Folglich wird die Ausgangssequenz der sich wiederholenden Monosaccharideinheiten in dem nativen Kapselsaccharid in den erfundungsgemäßen modifizierten Kapselsacchariden beibehalten.

**[0007]** Der Begriff „Saccharid“ umfasst sowohl Oligosaccharide (z.B. mit 2 bis 39 Monosaccharideinheiten) als auch Polysaccharide (z.B. mit 40 oder mehr Monosaccharideinheiten). Die sie natürlicherweise in Bakterien gefunden werden, liegen native Kapselsaccharide im Allgemeinen in Form von Polysacchariden vor. Polysaccharide können bearbeitet werden, um kürzere Oligosaccharide zu ergeben. Oligosaccharide können durch Reinigung und/oder Klassieren des nativen Polysaccharids (z.B. durch Hydrolyse in milder Säure, durch Erhitzen, durch Größenchromatographie etc.) erhalten werden.

**[0008]** Typischerweise sind die erfundungsgemäßen modifizierten Saccharide Oligosaccharide. Oligosaccharide können mit einem der vorstehend beschriebenen Klassierungsverfahren aus Polysacchariden erhalten werden.

**[0009]** Die erfundungsgemäßen modifizierten Kapselsaccharide sind aus nativen Kapselsacchariden erhält-

lich. Jedoch ist die vorliegende Erfindung nicht auf modifizierte Saccharide, die aus nativen Kapselsacchariden erhalten wurden, beschränkt. Die erfindungsgemäßen modifizierten Kapselsaccharide können mit anderen Verfahren, wie z.B. Total- oder Teilsynthese, erhalten werden.

**[0010]** Bei den erfindungsgemäßen modifizierten Kapselsacchariden kann die Einheit der Formel (I) von einer nicht-endständigen Hydroxylgruppe eines Kapselsaccharids abgeleitet sein oder von einer anomeren Hydroxyl-Endgruppe eines Kapselsaccharids.

**[0011]** Wenn die Einheit der Formel (I) von einer anomeren Hydroxylgruppe abgeleitet ist, ersetzt sie vorzugsweise die anomere Hydroxylgruppe durch, beispielsweise, eine reduktive Aminierungsreaktion. Reduktive Aminierungsreaktionen an Hydroxyl-Endgruppen eines Saccharids sind auf dem Fachgebiet gut bekannt.

**[0012]** Wenn die Einheit der Formel (I) von einer nicht-endständigen Hydroxylgruppe abgeleitet ist, ist sie vorzugsweise mit der nicht-endständigen Hydroxylgruppe über, beispielsweise, einen Carbamatrest verbunden. Folglich umfasst, in einer bevorzugten Ausführungsform, das erfindungsgemäße modifizierte Kapselsaccharid eine Einheit der Formel (Ia):

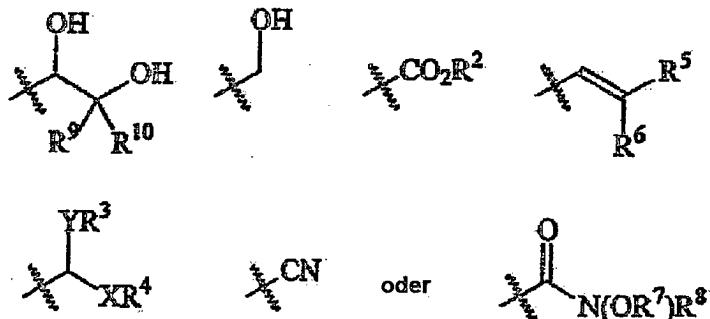


wobei R<sup>1</sup>, L und M die vorstehend angegebene Bedeutung haben.

**[0013]** Derartige Verbindungen können durch Derivatisieren einer freien Hydroxylgruppe auf einem Saccharid mit, beispielsweise, CDI und danach dem Umsetzen der Carbamat-Zwischenstufe mit einem Amin der Formel: HN(R<sup>1</sup>)-L-M, hergestellt werden.

**[0014]** Vorzugsweise ist R<sup>1</sup> gleich H. Vorzugsweise ist L ein C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylenrest. Stärker bevorzugt ist L gleich -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- . Der Rest L dient als Spacer, wenn die Einheit der Formel (I) verwendet wird, um in einem Saccharidprotein-Konjugat ein Kapselsaccharid mit einem Protein zu verbinden. Es wird festgestellt, dass ein Spacer zwischen dem Saccharid und dem Protein die Stabilität des Konjugats verbessert.

**[0015]** Der Fachmann wird viele voneinander verschiedene Funktionalitäten kennen, die ohne weiteres in eine Aldehydgruppe umgewandelt werden können. Jede beliebige derartige Funktionalität wäre als der maskierte Aldehydrest M geeignet. Vorzugsweise ist der maskierte Aldehydrest M ausgewählt aus



wobei:

R<sup>2</sup> ausgewählt ist aus H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-Cycloalkyl, C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl oder C<sub>5-12</sub>-Aryl-C<sub>1-6</sub>-alkyl (vorzugsweise ist R<sup>2</sup> nicht gleich H);

X und Y gleich oder voneinander verschieden sind und unabhängig ausgewählt sind aus O oder S;

R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> unabhängig ausgewählt sind aus C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-Cycloalkyl, C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl oder C<sub>5-12</sub>-Aryl-C<sub>1-6</sub>-alkyl; oder R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> verbunden sind, um einen C<sub>3</sub>-, C<sub>4</sub>-, C<sub>5</sub>-, C<sub>6</sub>-, C<sub>7</sub>- oder C<sub>8</sub>-Cycloalkyrring, welcher die Heteroatome X und Y enthält, zu bilden;

R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> unabhängig ausgewählt sind aus H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-Cycloalkyl, C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl oder C<sub>5-12</sub>-Aryl-C<sub>1-6</sub>-alkyl; oder R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> verbunden sind, um einen C<sub>3</sub>- oder C<sub>12</sub>-Cycloalkyrring zu bilden;

R<sup>9</sup> und R<sup>10</sup> unabhängig ausgewählt sind aus H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-Cycloalkyl, C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl oder C<sub>5-12</sub>-Aryl-C<sub>1-6</sub>-alkyl; oder R<sup>9</sup> und R<sup>10</sup> verbunden sind, um einen C<sub>3</sub>-Cycloalkyrring zu bilden; und

R<sup>7</sup> und R<sup>8</sup> unabhängig ausgewählt sind aus C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-Cycloalkykesten.

**[0016]** Der Begriff „Alkyl“ wird hier verwendet, um Allcylreste in sowohl geradkettigen als auch verzweigten Formen zu bezeichnen. Der Alkylest kann mit 1, 2 oder 3 Heteroatomen, ausgewählt aus -O-, -NH- oder -S-,

unterbrochen sein. Der Alkylrest kann auch mit 1, 2 oder 3 Doppel- und/oder Dreifachbindungen unterbrochen sein. Jedoch bezeichnet der Begriff „Alkyl“ gewöhnlich Alkylreste ohne Unterbrechungen mit Heteroatomen oder mit Doppel- oder Dreifachbindungen. Wo auf C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl Bezug genommen wird, bedeutet dies, dass der Alkylrest jede beliebige Anzahl von Kohlenstoffatomen zwischen 1 und 12 (z.B. 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>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>) enthalten kann. Gleichermaßen bedeutet, wo auf C<sub>1-6</sub>-Alkyl Bezug genommen wird, dies, dass der Alkylrest jede beliebige Anzahl von Kohlenstoffatomen zwischen 1 und 6 (z.B. C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>) enthalten kann.

**[0017]** Der Begriff „Alkylen“ wird hier verwendet, um Alkylenreste in sowohl geradkettigen als auch verzweigten Formen zu bezeichnen. Der Alkylenrest kann mit 1, 2 oder 3 Heteroatomen, ausgewählt aus -O-, -NH- oder -S-, unterbrochen sein. Der Alkylenrest kann auch mit 1, 2 oder 3 Doppel- und/oder Dreifachbindungen unterbrochen sein. Jedoch bezeichnet der Begriff „Alkylen“ gewöhnlich Alkylenreste ohne Unterbrechungen mit Heteroatomen oder mit Doppel- oder Dreifachbindungen. Wo auf C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkylen Bezug genommen wird, bedeutet dies, dass der Alkylenrest jede beliebige Anzahl von Kohlenstoffatomen zwischen 1 und 12 (z.B. 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>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>) enthalten kann. Gleichermaßen bedeutet, wo auf C<sub>1-6</sub>-Alkylen Bezug genommen wird, dies, dass der Alkylenrest jede beliebige Anzahl von Kohlenstoffatomen zwischen 1 und 6 (z.B. C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>) enthalten kann.

**[0018]** Der Begriff „Cycloalkyl“ schließt Cycloalkyl-, Polycycloalkyl- und Cycloalkenylreste ein, sowie Kombinationen von diesen mit Alkylresten, wie z.B. Cycloalkylalkylreste. Der Cycloalkylrest kann mit 1, 2 oder 3 Heteroatomen, ausgewählt aus -O-, -NH- oder -S-, unterbrochen sein. Jedoch bezeichnet der Begriff „Cycloalkyl“ gewöhnlich Cycloalkylreste ohne Unterbrechungen mit Heteroatomen. Beispiele für Cycloalkylreste schließen Cyclopentyl-, Cyclohexyl-, Cyclohexenyl-, Cyclohexylmethyl- und Adamantylreste ein. Wo auf C<sub>3-12</sub>-Cycloalkyl Bezug genommen wird, bedeutet dies, dass der Cycloalkylrest jede beliebige Anzahl von Kohlenstoffatomen zwischen 3 und 12 (z.B. 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>) enthalten kann.

**[0019]** Der Begriff „Aryl“ wird verwendet, um einen Kohlenstoff- und Wasserstoff-haltigen aromatischen Rest, wie z.B. Phenyl oder Naphthyl, zu bezeichnen. Wo auf C<sub>5-12</sub>-Aryl Bezug genommen wird, bedeutet dies, dass der Arylrest jede beliebige Anzahl von Kohlenstoffatomen zwischen 5 und 12 (z.B. 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>) enthalten kann.

**[0020]** Der Begriff „C<sub>5-12</sub>-Aryl-C<sub>1-6</sub>-alkyl“ bezeichnet Reste wie z.B. Benzyl, Phenylethyl und Naphthylmethyl.

**[0021]** Vorzugsweise ist der maskierte Aldehyd -CH(OH)CH<sub>2</sub>OH. Vorzugsweise umfasst das erfindungs-  
mäße modifizierte Kapselsaccharid eine Einheit der Formel -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH, stärker bevorzugt -OC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH.

**[0022]** Die vorliegende Erfindung stellt Verbindungen bereit, die einen maskierten Aldehydrest aufweisen. Die Verwendung eines maskierten Aldehyds verhindert vorteilhafterweise unerwünschte Nebenreaktionen während der Modifikation des Kapselsaccharids. Überdies kann eine Aldehydgruppe, wenn sie freigegeben ist, zur reduktiven Aminierungskupplung mit, beispielsweise, einer Aminogruppe auf einem Protein verwendet werden.

**[0023]** Im Allgemeinen erfüllt die Einheit der Formel (I) oder (Ia) die Funktion, einen Ansatzpunkt für die nachfolgende Umsetzung mit einem Aminrest eines Proteins bereit zu stellen. Folglich wird die Einheit der Formel (I) oder (Ia) gewöhnlich verwendet, um einen Linkerrest in einem Saccharidprotein-Konjugat zu bilden.

**[0024]** Jedoch kann die Einheit der Formel (I) oder (Ia), vorzugsweise (Ia), als ein blockierender Rest verwendet werden, um das Saccharid gegen Abbau, insbesondere Abbau durch Säurehydrolyse, zu stabilisieren. Diese weitere Verwendung der Einheit der Formel (Ia) kann als Alternative für oder zusätzlich zu ihrer Verwendung als ein Linkerrest sein. Die Verwendung von blockierenden Resten, um Kapselsaccharide zu stabilisieren, wird in der internationalen Patentanmeldung PCT/IB03/01436 beschrieben.

**[0025]** Wenn die Einheit der Formel (Ia) als ein stabilisierender blockierender Rest verwendet wird, weist das modifizierte Saccharid vorzugsweise mehr als eine dieser Einheiten auf, um eine stabilisierende Wirkung bereitzustellen. Beispielsweise können alle oder im Wesentlichen alle der Monosaccharideinheiten in dem modifizierten Saccharid einen blockierenden Rest aufweisen, der einen Rest der Formel (Ia) umfasst. Alternativ können mindestens 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% oder 90% der Monosaccharideinheiten einen blockierenden Rest aufweisen, der einen Rest der Formel (I) umfasst. Mindestens 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 oder 30 Monosaccharideinheiten in dem

modifizierten Saccharid können blockierende Reste aufweisen.

**[0026]** Desgleichen kann die Anzahl von blockierenden Resten an jeder Monosaccharideinheit variieren. Beispielsweise kann die Anzahl von blockierenden Resten an einer Monosaccharideinheit 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, vorzugsweise 1 bis 4 und stärker bevorzugt 1 oder 2, betragen.

**[0027]** Vorzugsweise umfasst das erfindungsgemäße modifizierte Saccharid eine Einheit der Formel (I) oder (Ia), die danach in einen Aldehyd umgewandelt wird. Folglich stellt die vorliegende Erfindung weiterhin ein modifiziertes Saccharid bereit, das eine Einheit der Formeln (II) oder, vorzugsweise, (IIa) umfasst:



wobei A, R<sup>1</sup> und L die vorstehend angegebene Bedeutung haben.

**[0028]** Die Umwandlung maskierter Aldehyde der Formel (I) oder (Ia) in Aldehyde der Formel (II) oder (IIa) bezieht einen einfachen Syntheseschritt ein. Beispielsweise können Diole durch oxidative Spaltung (z.B. NaIO<sub>4</sub>, Pb(OAc)<sub>4</sub>, etc.) in Aldehyde umgewandelt werden; Alkohole können durch Oxidation (z.B. Swern-Oxidation, Dess-Martin-Oxidation, Cr<sup>VI</sup>-Oxidationen, etc.) in Aldehyde umgewandelt werden; Alkene können durch oxidative Spaltung der Doppelbindung (z.B. Ozonolyse, gefolgt von reduktiver Aufarbeitung, OsO<sub>4</sub>/NaIO<sub>4</sub>, OsO<sub>4</sub>/Pb(OAc)<sub>4</sub>, etc.) in Aldehyde umgewandelt werden; Acetale können durch Säurehydrolyse in Aldehyde umgewandelt werden; Thioacetale können durch metallische Koordinierung, Alkylierung oder Oxidation (z.B. Hg<sup>II</sup>, Ag<sup>I</sup>, Ag<sup>II</sup>, Cu<sup>II</sup>, Mel, N-Bromsuccinimid, etc.) in Aldehyde umgewandelt werden; Carbonsäureester, Cyan-Verbindungen und Weinreb-Amide können durch eine geeignete Reduktion (z.B. NaBH<sub>4</sub>, DIBAL, etc.) in Aldehyde umgewandelt werden.

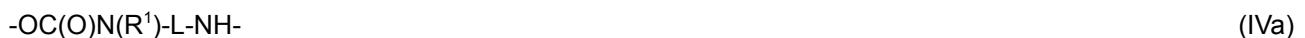
**[0029]** Vorzugsweise hat der maskierte Aldehyd M die Formel -CH(OH)CH<sub>2</sub>OH. Dieses Diol kann vorteilhaft unter Verwendung eines milden Periodat-Oxidationsmittels in den korrespondierenden Aldehyd umgewandelt werden. Es ist festgestellt worden, dass Periodat-Oxidantien, wie z.B. NaIO<sub>4</sub>, selektiv einen Aldehyd bilden, ohne andere empfindliche Funktionalitäten auf dem Kapselsaccharid zu beeinflussen.

**[0030]** Folglich umfasst, in einer bevorzugten Ausführungsform, das modifizierte Saccharid eine Einheit der Formel: -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)H, stärker bevorzugt -OC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)H.

#### Saccharidprotein-Konjugate

**[0031]** Das modifizierte Saccharid, das eine Einheit der Formel (II) oder (IIa) umfasst, kann verwendet werden, um das Saccharid an einen Proteinträger zu kuppeln. Die Kupplung erfolgt vorzugsweise über reduktive Aminierung einer Aminogruppe auf dem Protein mit der Aldehydgruppe auf dem modifizierten Saccharid, das eine Einheit der Formel (II) oder (IIa) umfasst. Von reduktiven Aminierungsreaktionen ist gut bekannt, dass sie ein zuverlässiges Verfahren zur Kupplung von Sacchariden und Proteinen sind. Gewöhnlich wird die Umsetzung unter Verwendung von NaBH<sub>3</sub>CN ausgeführt, obwohl andere geeignete Reduktionsmittel auch verwendet werden können.

**[0032]** Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung ein Saccharidprotein-Konjugat bereit, wobei die Saccharid- und Proteineinheiten über einen Rest der Formel (IV) oder, vorzugsweise, (IVa):



verbunden sind, wobei A, R<sup>1</sup> und L die vorstehend angegebene Bedeutung haben. Vorzugsweise ist in erfindungsgemäßen Konjugaten L gleich -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Saccharid- und Proteineinheiten durch einen Rest der Formel: -OC(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH verbunden. Das -NH- wird typischerweise von einem bestehenden Aminrest auf dem Protein, z.B. in einem Lysinrest, abgeleitet werden.

**[0033]** In den erfindungsgemäßen Protein-Saccharid-Konjugaten ist das Protein vorzugsweise ein Bakterien-toxin oder -toxoid, stärker bevorzugt ein Diphtherie- oder Tetanustoxin oder -toxoid. Diese werden gewöhnlich in konjugierten Impfstoffen verwendet. Das CRM<sub>197</sub>-Diphtherietoxoid ist besonders bevorzugt [1]. Andere ge-

eignete Trägerproteine schließen das N.meningitidis-Außenmembranprotein [2], synthetische Peptide [3,4], Hitzeschockproteine [5,6], Pertussisproteine [7,8], Protein D von H.influenzae [9], Cytokine [10], Lymphokine [10], Hormone [10], Wachstumsfaktoren [10], Toxin A oder B von C.difficile [11], Eisenaufnahmeproteine [12], etc. ein. Es ist möglich, Gemische von Trägerproteinen zu verwenden.

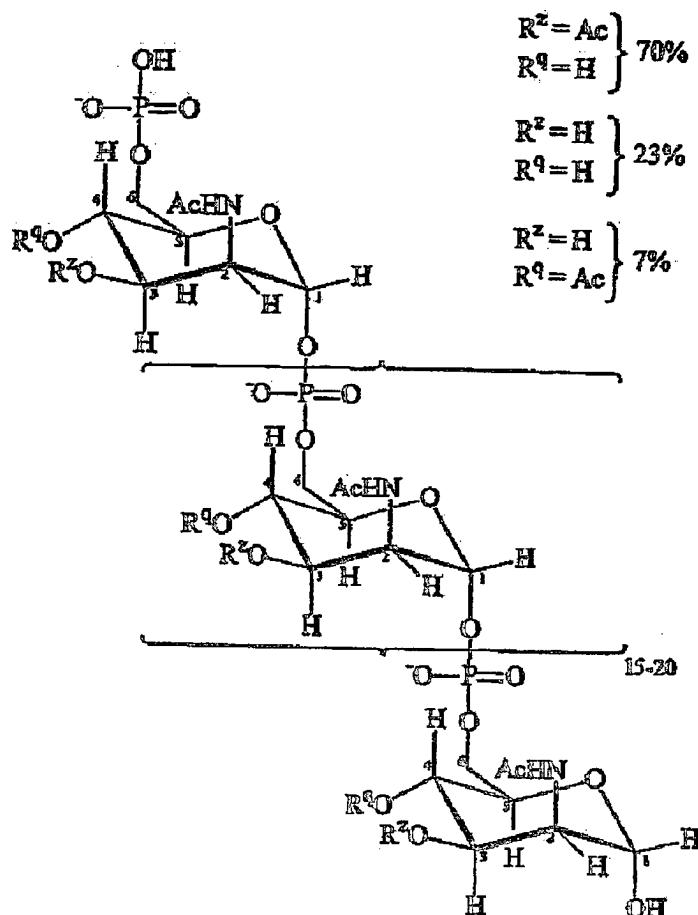
**[0034]** Nach der Konjugation können freie und konjugierte Saccharide getrennt werden. Es gibt viele geeignete Verfahren, einschließlich hydrophobe Chromatographie, tangentiale Ultrafiltration, Diafiltration, etc. [siehe auch Lit. 13, 14, etc.].

**[0035]** Ein einziges Trägerprotein kann mehrfache voneinander verschiedene Saccharide tragen [15].

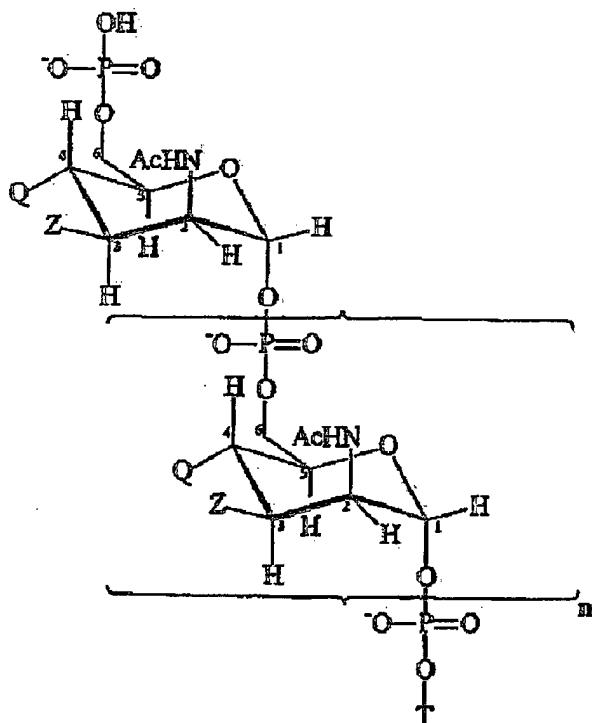
Modifizierte Neisseria-meningitidis-Serogruppe-A-Saccharide

**[0036]** In allen vorstehend beschriebenen Ausführungsformen ist das modifizierte Kapselsaccharid vorzugsweise ein modifiziertes Neisseria-meningitidis-Saccharid. Stärker bevorzugt ist das modifizierte Kapselsaccharid ein modifiziertes Neisseria-meningitidis-Serogruppe-A-Saccharid.

**[0037]** Das Neisseria-meningitidis-Serogruppe-A-Saccharid hat die folgende Struktur:



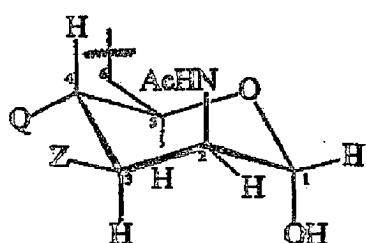
**[0038]** Dem gemäß stellt die vorliegende Erfindung ein Saccharid der Formel:



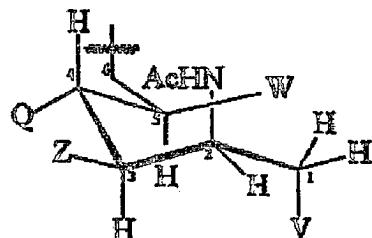
bereit,

wobei:

T eines aus der Formel (A) oder (B) ist:



(A)



(B)

n eine ganze Zahl von 1 bis 100 ist;

jeder Rest Z unabhängig ausgewählt ist aus -OH, -OAc, -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H;

jeder Rest Q unabhängig ausgewählt ist aus -OH, -OAc, -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H;

W ausgewählt ist aus -OH, -OAc, -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H (vorzugsweise ist W gleich OH);

V gleich -N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H ist;

wobei R<sup>1</sup>, L und M die vorstehend angegebene Bedeutung haben und mit der Maßgabe, dass das Saccharid mindestens eine Einheit der Formel -N(R<sup>1</sup>)-L-M, N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H, -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H umfasst.

**[0039]** Vorzugsweise ist n eine ganze Zahl von 15 bis 25.

**[0040]** Vorzugsweise ist T eines der Formel (A). Vorzugsweise umfasst das Saccharid mindestens eine Einheit der Formel -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H.

**[0041]** Vorzugsweise sind Q und Z ein Gemisch aus OH- und OAc-Resten in im Wesentlichen den gleichen relativen Anteilen wie in dem natürlichen Neisseria-meningitidis-Serogruppe-A-Saccharid, mit der Ausnahme, dass einer der Q- oder Z-Reste, vorzugsweise einer der Q-Reste, -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H ist.

#### Verfahren zur Herstellung modifizierter Saccharide

**[0042]** Diese Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Modifizierung eines Kapselsaccharids bereit, umfas-

send die Schritte:

- Bereitstellen eines Kapselsaccharids, das eine Hydroxylgruppe aufweist;
- Umsetzen der Hydroxylgruppe mit einem bifunktionellen Reagens in einem organischen Lösungsmittel;
- Umsetzen des Produkts von Schritt (b) mit einer Aminoverbindung der Formel (III):



wobei  $\text{R}^1$ , L und M die vorstehend angegebene Bedeutung haben.

**[0043]** Das Kapselsaccharid kann ein natives Kapselsaccharid (Oligosaccharid oder Polysaccharid) sein. Alternativ kann das Kapselsaccharid, beispielsweise, ein de-O-acetyliertes Kapselsaccharid, ein blockiertes Kapselsaccharid (wie in PCT/IB03/01436 beschrieben) oder ein Kapselsaccharid, das eine endständige Aminogruppe aufweist (z.B. durch reduktive Aminierung erhalten), sein.

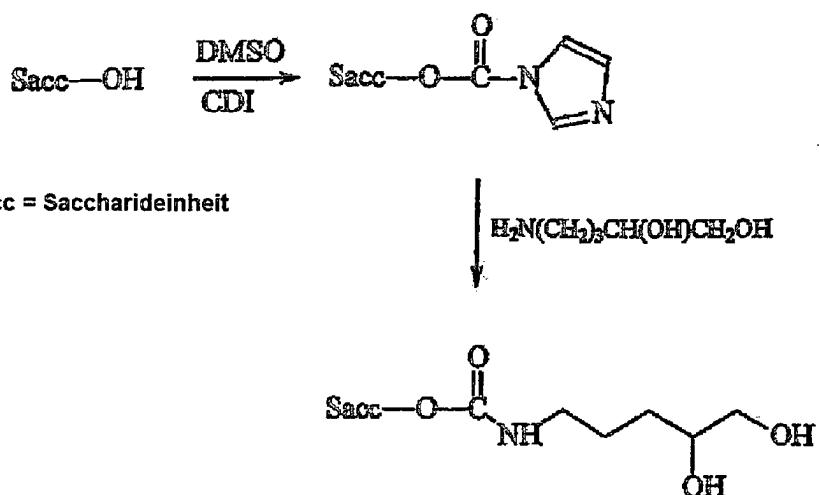
**[0044]** Der Begriff „bifunktionelles Reagens“ bedeutet jegliches Reagens, das fähig ist, die zweifache Funktion von (i) Bereitstellen eines ersten elektrophilen Kohlenstoffatoms zur Kupplung mit der/den Hydroxylgruppe(n) auf dem Saccharid; und (ii) Bereitstellen eines zweiten elektrophilen Kohlenstoffatoms zur Kupplung mit der in Schritt (b2) verwendeten Aminogruppe, zu erfüllen. Im Allgemeinen wird das zweite elektrophile Kohlenstoffatom während Schritt (b) aus dem ersten elektrophilen Kohlenstoffatom regeneriert. Das bifunktionelle Reagens stellt eine -C(O)-Verbindung zwischen dem Polysaccharid und der Aminoverbindung bereit.

**[0045]** Bifunktionelle Reagenzien zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung schließen 1,1'-Carbonyldimidazol (CDI), Carbonyldi-1,2,4-triazol (CDT), Carbonyldi-1,2,3-benzotriazol (CDB), Diphenylcarbonat, Cyanbromid, Phosgen oder Triphosgen ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Der Fachmann wird andere bifunktionelle Reagenzien kennen, die die gleiche Funktion erfüllen können wie diese. CDI ist bevorzugt, weil es ein besonders mildes Reagens ist und die Bildung stark saurer Gase, wie z.B. HCl oder HBr, vermeidet.

**[0046]** Vorzugsweise ist das organische Lösungsmittel ein aprotisches Lösungsmittel. Aprotische Lösungsmittel sind dem Fachmann gut bekannt und enthalten keine ionisierbaren Wasserstoffatome. Diese Lösungsmittel sind vorteilhaft, weil sie durch Erhöhen der Nukleophilie der Hydroxylgruppe(n) die Umsetzung der Hydroxylgruppe(n) auf dem Saccharid mit dem bifunktionellen Reagens erleichtern. Geeignete aprotische Lösungsmittel schließen Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Formamid, Hexamethylphosphoramide (HMPA), Hexamethylphosphortriamid (HMPT), 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinon (DMPU) oder Dimethylacetamid (DMAC) ein, sind aber nicht darauf beschränkt. DMSO ist bevorzugt.

**[0047]** In vorstehendem Schritt (c) wird die nach Schritt (b) gebildete intermediäre Carbamatverbindung mit einem Amin der Formel (III) umgesetzt. Vorzugsweise ist das Amin der Formel (III) das tris-Nukleophil  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ .

**[0048]** Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren wird in nachstehendem Schema 1 veranschaulicht:



Schema 1

**[0049]** In Schema 1 wird das Saccharid (z.B. Men-A-Polysaccharid oder -Oligosaccharid) zuerst durch eine

seiner Hydroxylgruppen unter Verwendung von CDI in DMSO-Lösungsmittel aktiviert. Das so erhaltene Imidazolcarbamid wird durch das tris-Nukleophil  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$  abgefangen, was das modifizierte Saccharid, das eine maskierte Aldehyd-Funktionalität aufweist, liefert. [Fig. 2](#) zeigt den Aktivierungsschritt für ein *Neisseria-meningitidis*-Serogruppe-A-Saccharid.

**[0050]** Die modifizierten Saccharide können alternativ in einem Einstufenverfahren durch Umsetzen einer oder mehrerer Hydroxylgruppen auf einem Kapselsaccharid mit einem Reagens der Formel  $\text{XC(O)N(R}^1\text{)-L-M}$  hergestellt werden, wobei X eine Abgangsgruppe ist und R<sup>1</sup>, L und M die vorstehend angegebene Bedeutung haben. Geeignete Abgangsgruppen schließen -Cl, -Br, -CF<sub>3</sub>, -OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> oder -CCl<sub>3</sub> ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

**[0051]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zur Modifizierung eines Saccharids wie vorstehend beschrieben bereitgestellt, wobei das Verfahren weiterhin die Schritte (d) Demaskieren des maskierten Aldehydrests M, dabei Bereitstellen einer Aldehyd-Verbindung; und (e) Verbinden der Aldehyd-Verbindung mit einem Protein durch eine reduktive Aminierungsreaktion, umfasst. In diesem Verfahren ist der maskierte Aldehydrest M vorzugsweise -CH(OH)CH<sub>2</sub>OH, der Demaskierungsschritt ist vorzugsweise eine Periodatspaltung und das Reduktionsmittel in der reduktiven Aminierungsreaktion ist vorzugsweise NaBH<sub>3</sub>CN. Diese bevorzugte Ausführungsform wird in [Fig. 1](#) gezeigt. In [Fig. 1](#) stellt PS ein Polysaccharid oder Oligosaccharid dar, das von nativem *Neisseria-meningitidis*-Serogruppe-A-Saccharid abgeleitet ist.

#### Arzneimittel und Verfahren

**[0052]** Die Erfindung stellt ein Arzneimittel bereit, umfassend (a) ein erfindungsgemäßes modifiziertes Saccharid und/oder ein erfindungsgemäßes Konjugat und (b) einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

**[0053]** Wo ein Konjugat vorliegt, kann die Zusammensetzung auch freies Trägerprotein umfassen [16].

**[0054]** „Pharmazeutisch verträgliche Träger“ schließen jeglichen Träger ein, der nicht selbst die Produktion von Antikörpern auslöst, die für das Individuum, das die Zusammensetzung verabreicht bekommt, schädlich sind. Geeignete Träger sind typischerweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle, wie z.B. Proteine, Polysaccharide, Polymilchsäuren, Polyglycolsäuren, polymere Aminosäuren, Aminosäure-Copolymere, Trehalose [17], Lipidaggregate (wie z.B. Ölträpfchen oder Liposome) und inaktive Viruspartikel. Derartige Träger sind Durchschnittsfachleute gut bekannt. Die Impfstoffe können auch Verdünnungsmittel, wie z.B. Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Glycerol, etc. enthalten. Zusätzlich können Hilfssubstanzen, wie z.B. Netzmittel oder Emulgatoren, pH-Puffersubstanzen und dergleichen, vorhanden sein. Eine gründliche Diskussion pharmazeutisch verträglicher Exzipienten ist in Remington's Pharmaceutical Sciences, z.B. die 2000er Ausgabe (ISBN: 0683306472), verfügbar.

**[0055]** Typischerweise werden die Zusammensetzungen als Injektionsmittel hergestellt, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen; feste Formen, die zur Lösung, oder Suspension, in flüssigen Vehikeln vor der Injektion geeignet sind, können auch hergestellt werden. Die Zubereitung kann zur erhöhten adjuvanten Wirkung auch emulgiert oder in Liposomen verkapselt werden. Die direkte Abgabe der Zusammensetzungen wird im Allgemeinen parenteral (z.B. durch Injektion, entweder subkutan, intraperitoneal, intravenös oder intramuskulär oder abgegeben in den Zwischenraum eines Gewebes) erfolgen. Die Zusammensetzungen können auch in eine Verletzung verabreicht werden. Andere Applikationsweisen schließen orale und pulmonale Verabreichung, rektale (Zäpfchen) und transdermale oder transkutane Anwendungen [z.B. Lit. 18], Nadeln und Hypersprays ein. Die Dosierungsbehandlung kann eine Einzeldosis oder ein Mehrdosenplan (z.B. einschließlich Auffrischungsdosen) sein.

**[0056]** Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist vorzugsweise steril, gepuffert und/oder pyrogenfrei.

**[0057]** Die Zusammensetzung ist vorzugsweise eine immunogene Zusammensetzung (z.B. ein Impfstoff). Impfstoffe, die auf Sacchariden oder Saccharidprotein-Konjugaten basieren, sind auf dem Fachgebiet gut bekannt.

**[0058]** Immunogene Zusammensetzungen umfassen eine immunologisch wirksame Menge eines Saccharid-Antigens, sowie, bei Bedarf, jede andere der anderen aufgeführten Komponenten. Mit „immunologisch wirksamer Menge“ ist gemeint, dass die Verabreichung dieser Menge an ein Individuum, entweder als Einzeldosis oder als Teil einer Serie, zur Behandlung oder Vorbeugung wirksam ist. Diese Menge variiert je nach Gesundheit und körperlichem Zustand des zu behandelnden Individuums, dem Alter, der taxonomischen Gruppe des

zu behandelnden Individuums (z.B. nicht-menschlicher Primat, Primat, etc.), der Fähigkeit des Immunsystems des Individuums, Antikörper zu synthetisieren, dem Grad des gewünschten Schutzes, der Formulierung des Impfstoffs, der Beurteilung der medizinischen Situation durch den behandelnden Arzt und anderen relevanten Faktoren. Es wird erwartet, dass die Menge in einen verhältnismäßig breiten Bereich fallen wird, der durch Routineversuche bestimmt werden kann. Die Dosierungsbehandlung kann ein Einzeldosisplan oder ein Mehrdosenplan (z.B. einschließlich Auffrischungsdosen) sein. Der Impfstoff kann zusammen mit anderen immunregulatorischen Stoffen verabreicht werden.

**[0059]** Die immunogene Zusammensetzung kann einen Hilfstoff einschließen. Bevorzugte Hilfstoffe, um die Wirksamkeit der Zusammensetzung zu erhöhen, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf (A) Aluminiumverbindungen (z.B. Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat, Aluminiumhydroxyphosphat, Oxyhydroxid, Orthophosphat, Sulfat, etc. [z.B. siehe Kapitel 8 & 9 von Lit. 19]) oder Gemische aus voneinander verschiedenen Aluminiumverbindungen, wobei die Verbindungen jede geeignete Form (z.B. ein Gel, kristallin, amorph etc.) annehmen können und wobei Adsorption bevorzugt ist; (B) MF59 (5% Squalen, 0,5% Tween 80 und 0,5% Span 85, unter Verwendung eines Mikrofluidizers in Submikronpartikel formuliert) [siehe Kapitel 10 von Lit. 19; siehe auch Lit. 20]; (C) Liposome [siehe Kapitel 13 und 14 von Lit. 19]; (D) ISCOMs [siehe Kapitel 23 von Lit. 19], das ohne zusätzliches Detergens sein kann [21]; (E) SAF, das 10% Squalen, 0,4% Tween 80, 5% Pluronic-Blockpolymer L121 und thr-MDP enthält, entweder in eine Submikronemulsion mikrofluidifiziert oder verwirbelt, um eine Emulsion mit größerer Partikelgröße zu bilden [siehe Kapitel 12 von Lit. 19]; (F) Ribi<sup>TM</sup> adjuvantes System (RAS), (Ribi Immunochem), das 2% Squalen, 0,2% Tween 80 und eine oder mehrere Bakterienzellwandkomponenten aus Monophosphoryllipid A (MPL), Trehalosedimycarat (TDM) und Zellwandskelett (CWS), vorzugsweise MPL + CWS (Detox<sup>TM</sup>), enthält; (G) Saponin-Hilfstoffe, wie z.B. QuilA oder QS21 [siehe Kapitel 22 von Lit. 19], auch bekannt als Stimulon<sup>TM</sup>; (H) Chitosan [z.B. 22]; (I) komplettes Freundsches Adjuvans (CFA) und inkomplettes Freundsches Adjuvans (IFA); (J) Cytokine, wie z.B. Interleukine (z.B. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), Interferone (z.B. Interferon- $\gamma$ ), Makrophagenkoloniestimulierender Faktor, Tumornekrosefaktor, etc. [siehe Kapitel 27 & 28 von Lit. 19]; (K) Mikropartikel (d.h. ein Partikel von ~100 nm bis ~150  $\mu$ m im Durchmesser, stärker bevorzugt ~200 nm bis ~30  $\mu$ m im Durchmesser und am meisten bevorzugt ~500 nm bis ~10  $\mu$ m im Durchmesser), die aus Materialien gebildet sind, die bioabbaubar und ungiftig sind (z.B. eine Poly( $\alpha$ -hydroxsäure), eine Polyhydroxybuttersäure, ein Polyorthoester, ein Polyanhydrid, ein Polycaprolacton, etc.); (L) Monophosphoryllipid A (MPL) oder 3-O-deacyliertes MPL (3dMPL) [z.B. Kapitel 21 von Lit. 19]; (M) Kombinationen von 3dMPL mit, beispielsweise, QS21 und/oder Öl-in-Wasser-Emulsionen [23]; (N) Oligonukleotide, die CpG-Motive umfassen [24], d.h. die mindestens ein CG-Dinukleotid enthalten, wobei gegebenenfalls 5-Methylcytosin anstelle von Cytosin verwendet wird; (O) ein Polyoxyethylenether oder ein Polyoxyethylenester [25]; (P) ein Polyoxyethylen-Sorbitanester-Tensid in Kombination mit einem Octoxinol [26] oder ein Polyoxyethylenalkylether- oder -ester-Tensid in Kombination mit mindestens einem zusätzlichen nicht-ionischen Tensid, wie z.B. ein Octoxinol [27]; (Q) ein immunstimulierendes Oligonukleotid (z.B. ein CpG-Oligonukleotid) und ein Saponin [28]; (R) ein Immunstimulans und ein Partikel eines Metallsalzes [29]; (S) ein Saponin und eine Öl-in-Wasser-Emulsion [30]; (T) ein Saponin (z.B. QS21) + 3dMPL + IL-12 (gegebenenfalls + ein Sterol) [31]; (U) hitzelabiles E.coli-Enterotoxin („LT“) oder entgiftete Mutanten davon, wie z.B. die K63- oder R72-Mutanten [z.B. Kapitel 5 von Lit. 32]; (V) Choleratoxin („CT“) oder entgiftete Mutanten davon [z.B. Kapitel 5 von Lit. 32]; (W) Doppelstrang-RIVA; (X) Monophosphoryllipid-A-Nachahmer, wie z.B. Aminoalkylglucosaminidphosphat-Derivate, z.B. RC-529 [33]; (Y) Polyphosphazen (PCPP); oder (Z) ein Bio-Anhaftmittel [34], wie z.B. veresterte Hyaluronsäure-Mikrokügelchen [35], oder ein Schleimhaut-Anhaftmittel, ausgewählt aus quervernetzten Derivaten von Poly(acrylsäure), Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polysacchariden und Carboxymethylcellulose. Andere Substanzen, die als Immunstimulanten dienen, um die Wirksamkeit der Zusammensetzung zu erhöhen [siehe z.B. Kapitel 7 von Lit. 19], können auch verwendet werden. Aluminiumsalze (insbesondere Aluminiumphosphate und/oder Hydroxide) sind bevorzugte Hilfstoffe für parenterale Immunisierung. Mutante Toxine sind bevorzugte Mukosa-Hilfstoffe.

**[0060]** Muramylpeptide schließen N-Acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-Acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), N-Acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)ethylamin (MTP-PE) etc. ein.

**[0061]** Sobald sie formuliert sind, können die erfundungsgemäß Zusammensetzungen direkt an den Patienten verabreicht werden. Die zu behandelnden Patienten können Tiere sein; im Besonderen können menschliche Patienten behandelt werden. Die Impfstoffe sind besonders nützlich für die Impfung von Kindern und Teenagern.

**[0062]** Erfundungsgemäß Impfstoffe können entweder prophylaktisch (d.h. um einer Infektion vorzubeugen) oder therapeutisch (d.h. um eine Erkrankung nach Infektion zu behandeln) erfolgen, werden aber typischer-

weise prophylaktisch sein.

**[0063]** Ebenso gut wie modifizierte Saccharide kann die Zusammensetzung weitere antigene Komponenten umfassen. Zum Beispiel kann die Zusammensetzung ein oder mehrere weitere Saccharide (ob erfindungsgemäß modifiziert oder nicht) einschließen. Zum Beispiel kann die Zusammensetzung Saccharide von den Serogruppen C, W135 und Y von *N.meningitidis* (z.B. zusätzlich zu einem modifizierten Men-A-Saccharid) umfassen. Diese werden typischerweise mit Trägerproteinen konjugiert sein und Saccharide von voneinander verschiedenen Serogruppen von *N.meningitidis* können mit den gleichen oder mit voneinander verschiedenen Trägerproteinen konjugiert sein. Wo ein Gemisch Kapselsaccharide von beiden Serogruppen A und C umfasst, ist es bevorzugt, dass das Verhältnis (Gew./Gew.) von Men-A-Saccharid:Men-C-Saccharid größer als 1 ist (z.B. 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 oder höher). Verbesserte Immunogenität der Men-A-Komponente ist beobachtet worden, wenn sie im Überschuss (Masse/Dosis) gegenüber der Men-C-Komponente vorliegt.

**[0064]** Die Zusammensetzung kann auch Protein-Antigene umfassen.

**[0065]** Antigene, die in die erfindungsgemäße Zusammensetzung eingeschlossen werden können, schließen ein:

- Antigene von *Helicobacter pylori*, wie z.B. CagA [36 bis 39], VacA [40, 41], NAP [42, 43, 44], HopX [z.B. 45], HopY [z.B. 45] und/oder Urease.
- ein Protein-Antigen von *N.meningitidis* der Serogruppe B, wie z.B. diejenigen in Lit. 46 bis 52, wobei Protein ,287' (siehe nachstehend) und Derivate (z.B. ,ΔG287') besonders bevorzugt sind.
- eine Außenmembran-Vesikel (OMV)-Zubereitung von *N.meningitidis* der Serogruppe B, wie z.B. die in Lit. 53, 54, 55, 56, etc. offenbarten.
- ein Saccharid-Antigen von *N.meningitidis* der Serogruppe C, wie z.B. das in Lit. 57 offenbarte Oligosaccharid von der Serogruppe C [siehe auch Lit. 58].
- ein Saccharid-Antigen von *Streptococcus pneumoniae* [z.B. 59, 60, 61].
- ein Antigen vom Hepatitis-A-Virus, wie z.B. ein inaktiviertes Virus [z.B. 62, 63].
- ein Antigen vom Hepatitis-B-Virus, wie z.B. die Oberflächen- und/oder Core-Antigene [z.B. 63, 64].
- ein Antigen vom Hepatitis-C-Virus [z.B. 65].
- ein Antigen von *Bordetella pertussis*, wie z.B. Pertussis-Holotoxin (PT) und filamentöses Hämagglutinin (FHA) von *B.pertussis*, gegebenenfalls auch in Kombination mit Pertaktin und/oder Agglutinogenen 2 und 3 [z.B. Lit. 66 & 67].
- ein Diphtherie-Antigen, wie z.B. ein Diphtherietoxoid [z.B. Kapitel 3 von Lit. 68], z.B. die CRM<sub>197</sub>-Mutante [z.B. 69].
- ein Tetanusantigen, wie z.B. ein Tetanustoxoid [z.B. Kapitel 4 von Lit. 68].
- ein Saccharid-Antigen von *Haemophilus influenzae* B [z.B. 58].
- ein Antigen von *N.gonorrhoeae* [z.B. 46, 47, 48].
- ein Antigen von *Chlamydia pneumoniae* [z.B. 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76].
- ein Antigen von *Chlamydia trachomatis* [z.B. 77].
- ein Antigen von *Porphyromonas gingivalis* [z.B. 78].
- Polioantigen(e) [z.B. 79, 80], wie z.B. IPV oder OPV.
- Tollwutantigen(e) [z.B. 81], wie z.B. lyophilisiertes, inaktiviertes Virus [z.B. 82, RabAvert<sup>TM</sup>].
- Masern-, Mumps- und/oder Rötelnantigene [z.B. Kapitel 9, 10 & 11 von Lit. 68].
- Influenza-Antigene) [z.B. Kapitel 19 von Lit. 68], wie z.B. die Hämagglutinin- und/oder Neuraminidase-Oberflächenproteine.
- ein Antigen von *Moraxella catarrhalis* [z.B. 83].
- ein Antigen von *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* der Gruppe B) [z.B. 84, 85].
- ein Saccharid-Antigen von *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* der Gruppe B).
- ein Antigen von *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* der Gruppe A) [z.B. 85, 86, 87].
- ein Antigen von *Staphylococcus aureus* [z.B. 88].
- ein Antigen von *Bacillus anthracis* [z.B. 89, 90, 91].
- ein Antigen eines Virus aus der Familie der Flaviviridae (Gattung: Flavivirus), wie z.B. vom Gelbfiebervirus, Japanische-Enzephalitis-Virus, von vier Serotypen des Dengue-Virus, vom Zeckenenzephalitis-Virus (tick-borne encephalitis virus), West-Nil-Virus.
- ein Pestivirusantigen, wie z.B. vom klassischen Schweinepest-Virus, bovinen Virusdiarrhoe-Virus und/oder Border-Disease-Virus.
- ein Parvovirusantigen, z.B. vom Parvovirus B19.
- ein Prionprotein (z.B. das CJD-Prionprotein)
- ein Amyloidprotein, wie z.B. ein beta-Peptid [92]
- ein Krebsantigen, wie z.B. die in Tabelle 1 von Lit. 93 oder in Tabellen 3 & 4 von Lit. 94 aufgeführten.

**[0066]** Die Zusammensetzung kann eines oder mehrere dieser weiteren Antigene umfassen.

**[0067]** Toxische Proteinantigene können gegebenenfalls entgiftet werden (z.B. Entgiftung des Pertussistoxins durch chemische und/oder genetische Mittel [67]).

**[0068]** Wo ein Diphtherieantigen in die Zusammensetzung eingeschlossen ist, ist es bevorzugt, auch das Tetanusantigen und Pertussisantigene einzuschließen. Gleichermaßen gilt, wo ein Tetanusantigen eingeschlossen ist, dass es bevorzugt ist, auch Diphtherie- und Pertussisantigene einzuschließen. Gleichermaßen gilt, wo ein Pertussisantigen eingeschlossen ist, dass es bevorzugt ist, auch Diphtherie- und Tetanusantigene einzuschließen.

**[0069]** Die Antigene sind vorzugsweise an ein Aluminiumsalz adsorbiert.

**[0070]** Die Antigene in der Zusammensetzung werden typischerweise mit einer Konzentration von jeweils mindestens 1 µg/ml vorliegen. Im Allgemeinen wird die Konzentration eines gegebenen Antigens ausreichen, um eine Immunantwort gegen das Antigen hervorzurufen.

**[0071]** Als Alternative zur Verwendung von Proteinantigenen in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung, kann Nukleinsäure, die das Antigen codiert, verwendet werden [z.B. Lit. 95 bis 103]. Protein-Komponenten der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können somit durch Nukleinsäure (vorzugsweise DNA, z.B. in Form eines Plasmids), die das Protein codiert, ersetzt werden.

**[0072]** Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Hervorrufen einer Antikörperantwort bei einem Säuger bereit, wobei das Verfahren das Verabreichen eines erfindungsgemäßen Arzneimittels an den Säuger umfasst. Der Säuger ist vorzugsweise ein Mensch. Der Mensch kann ein Erwachsener oder, vorzugsweise, ein Kind sein. Die Antikörperantwort schützt vorzugsweise gegen Infektion mit *N.meningitidis* der Serogruppe A.

**[0073]** Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Immunisierung eines Säugers bereit, wobei das Verfahren das Verabreichen eines erfindungsgemäßen Arzneimittels an den Säuger umfasst.

**[0074]** Diese Erfindung stellt auch ein erfindungsgemäßes modifiziertes Saccharid, oder ein erfindungsgemäßes Konjugat, zur Verwendung als ein Medikament bereit.

**[0075]** Die Erfindung stellt auch die Verwendung eines erfindungsgemäßes modifizierten Saccharids, oder eines erfindungsgemäßes Konjugats, zur Herstellung eines Medikaments zur Vorbeugung oder Behandlung einer durch Kapselbakterien verursachten Erkrankung bereit. Durch *Neisseria* verursachte Erkrankungen schließen Meningitis, Septikämie und Gonorrhö ein. Durch *H. influenzae* verursachte Erkrankungen schließen Mittelohrentzündung, Bronchitis, Lungenentzündung, Zellulitis, Herzbeutelentzündung und Meningitis ein. Durch *Pneumococcus* verursachte Erkrankungen schließen Meningitis, Sepsis und Lungenentzündung ein. Die Vorbeugung gegen und/oder Behandlung von bakterieller Meningitis ist somit bevorzugt.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0076]** [Fig. 1](#) zeigt die Synthese eines Saccharidprotein-Konjugats aus einem CDI-aktivierten Saccharid.

**[0077]** [Fig. 2](#) zeigt die Umsetzung einer Hydroxylgruppe auf einem *Neisseria*-Meningitidis-Serogruppe-A-Saccharid mit CDI.

**[0078]** [Fig. 3](#) zeigt die Ergebnisse vergleichender Immunogenitätsuntersuchungen. Das Diagramm zeigt GMT-Werte für fünf voneinander verschiedene Saccharidimmunogene (A) bis (E) und die Tabelle zeigt bakterizide Serumtitre gegen den Serogruppe-A-Stamm F8238.

#### ARTEN, DIE ERFINDUNG AUSZUFÜREN

##### Vergleichende Immunogenitätsuntersuchungen

**[0079]** Die vorliegende Erfindung stellt eine verbesserte Art der Verbindung zwischen einem Saccharid und einem Protein bereit. Außerdem wurde festgestellt, dass erfindungsgemäße Saccharidprotein-Konjugate im Vergleich zu anderen Arten der Saccharidprotein-Konjugate verbesserte Immunogenität aufweisen.

**[0080]** Zu Vergleichszwecken wurde ein Saccharidprotein-Konjugat, das eine alternative Verbindung aufweist, hergestellt. Ein modifiziertes *Neisseria-meningitidis*-Serogruppe-A-Polysaccharid wurde durch CDI-Aktivierung einer Hydroxylgruppe auf dem Saccharid, gefolgt von Quenching der CDI-Carbamat-Zwischenstufe mit  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-CO}_2\text{H}$ , hergestellt. Dieses modifizierte Polysaccharid wurde verwendet, um durch EDAC-aktivierte Kupplung der Carboxylgruppe mit CRM<sub>197</sub> ein Saccharidprotein-Konjugat herzustellen. Folglich wurden das Polysaccharid und CRM<sub>197</sub> über den Linkerrest -OC(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(O)NH- gekuppelt. Für die Zwecke dieser vergleichenden Untersuchung wird dieses Verfahren der Herstellung eines Saccharidprotein-Konjugats „das Carbodiimidverfahren“ genannt.

**[0081]** Das nach dem Carbodiimidverfahren hergestellte Saccharidprotein-Konjugat wurde mit einem erfindungsgemäßen Saccharidprotein-Konjugat verglichen. Folglich wurde ein modifiziertes *Neisseria-meningitidis*-Serogruppe-A-Polysaccharid durch CDI-Aktivierung einer Hydroxylgruppe auf dem Polysaccharid, gefolgt von Quenching der CDI-Carbamat-Zwischenstufe mit dem tris-Nukleophil  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH(OH)CH}_2\text{OH}$ , hergestellt. Im Anschluss an Periodatspaltung, um den Aldehyd freizugeben, wurde das modifizierte Polysaccharid durch reduktive Aminierung mit CRM<sub>197</sub> gekuppelt (wie in [Fig. 1](#) erläutert). Folglich wurden das Polysaccharid und CRM<sub>197</sub> über den Linkerrest -OC(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH- gekuppelt. Für die Zwecke dieser vergleichenden Untersuchung wird dieses Verfahren der Herstellung eines Saccharidprotein-Konjugats „das reduktive-Aminierungsverfahren“ genannt.

**[0082]** Die Immunogenitäten der nach dem Carbodiimidverfahren und dem reduktive-Aminierungsverfahren hergestellten Konjugate (mit zwei voneinander verschiedenen Verhältnissen) wurden in Balb/c-Mäusen bestimmt. Die Konjugate wurden als zwei Dosen (0 & 14 Tage) von 2 µg/Dosis (ausgedrückt als Masse des Saccharids) verabreicht. An Tag 25 wurde eine Blutprobe genommen und die IgG-Titer (GMT) wurden bestimmt. Außerdem wurden die bakteriziden Serum-Antikörper (SBA)-Titer gegen MenA, Stamm F8238, bewertet. Zum Vergleich wurden auch ein erfindungsgemäßes Oligosaccharid-Konjugat und unkonjugiertes Polysaccharid getestet.

**[0083]** Die Ergebnisse werden in [Fig. 3](#) gezeigt. Das Oligosaccharid-Konjugat (C) ergab den besten GMT-Wert und einen SBA-Titer von 1024. Im Gegensatz dazu ergab einfaches Polysaccharid (E) einen schlechten GMT-Titer (vergleichbar mit der physiologische-Kochsalzlösung-Kontrolle) und einen schlechten SBA-Titer (<4). Wenn es unter Verwendung des Carbodiimidverfahrens mit CRM<sub>197</sub> konjugiert wurde (D), stiegen beide Titer an (SBA: 128). Wenn es unter Verwendung des reduktive-Aminierungsverfahrens mit CRM<sub>197</sub> konjugiert wurde (A und B), stiegen die GMT- und SBA-Titer an (SBA: zwischen 512 und 1024). Der mit dem unter Verwendung der reduktiven Aminierung hergestellten Konjugat erzielte SBA-Titer entsprach dem des konjugierten Oligosaccharids.

**[0084]** Ein vergleichendes ELISA-Programm unter Verwendung eines Meerschweinchenmodells bestätigte die mit den Balb/C-Mäusen erhaltenen Ergebnisse.

#### LITERATUR (deren Inhalte hier vollständig aufgenommen sind)

- [1] Research Disclosure, 453077 (jan 2002)
- [2] EP-A-0372501
- [3] EP-A-0378881
- [4] EP-A-0427347
- [5] WO93/17712
- [6] WO94/03208
- [7] WO98/58668
- [8] EP-A-0471177
- [9] WO00/56360
- [10] WO91/01146
- [11] WO00/61761
- [12] WO01/72337
- [13] Lei et al. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264
- [14] WO00/38711
- [15] WO99/42130
- [16] WO96/40242
- [17] WO00/56365
- [18] WO98/20734
- [19] Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, Hrsg. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN

- 0-306-44867-X).
- [20] WO90/14837.
- [21] WO00/07621.
- [22] WO99/27960.
- [23] Europäische Patentanmeldungen 0835318, 0735898 und 0761231.
- [24] Krieg (2000) Vaccine 19:618-622; Krieg (2001) Curr opin Mol Ther 2001 3:15-24 WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 und WO98/52581 etc.
- [25] WO99/52549.
- [26] WO01/21207.
- [27] WO01/21152.
- [28] WO00/62800.
- [29] WO00/23105.
- [30] WO99/11241.
- [31] WO98/57659.
- [32] Del Giudice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine, Bd. 19, Nummer 1.
- [33] Johnson et al. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
- [34] Internationale Patentanmeldung WO00/50078.
- [35] Singh et al. (2001) J. Cont. Rele. 70:267-276.
- [36] Covacci & Rappuoli (2000) J. Exp. Med. 19:587-592.
- [37] WO93/18150.
- [38] Covacci et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5791-5795.
- [39] Tummuru et al. (1994) Infect. Immun. 61:1799-1809.
- [40] Marchetti et al. (1998) Vaccine 16:33-37.
- [41] Telford et al. (1994) J. Exp. Med. 179:1653-1658.
- [42] Evans et al. (1995) Gene 153:123-127.
- [43] WO96/01272 & WO96/01273, insbesondere SEQ ID NO:6.
- [44] WO97/25429.
- [45] WO98/04702.
- [46] WO99/24678.
- [47] WO99/36544.
- [48] WO99/57280.
- [49] WO00/22430.
- [50] Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
- [51] WO96/29412.
- [52] Pizza et al. (2000) Science 287:1816-1820.
- [53] WO01/52885.
- [54] Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
- [55] Fukasawa et al. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
- [56] Rosenqvist et al. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333.
- [57] Castantino et al. (1992) Vaccine 10:691-698.
- [58] Castantino et al. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
- [59] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
- [60] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285.
- [61] Jedrzejas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
- [62] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
- [63] Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
- [64] Gerlich et al. (1990) Vaccine 8 Erg.:S63-68 & 79-80.
- [65] Hsu et al. (1999) Clin Liver Dis 3: 901-915.
- [66] Gustafsson et al. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
- [67] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238.
- [68] Vaccines (1988) Hrsg. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [69] Del Guidice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
- [70] WO02/02606.
- [71] Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
- [72] Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
- [73] Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis. 181(Erg.3):S524-S527.
- [74] WO99/27105.
- [75] WO00/27994.
- [76] WO00/37494.
- [77] WO99/28475.

- [78] Ross et al. (2001) Vaccine 19:4135-4142.  
 [79] Sutter et al. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.  
 [80] Zimmerman & Spann (1999) Am Physician 59:113-118, 125-126.  
 [81] Dreesen (1997) Vaccine 15 Erg.:S2-6.  
 [82] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16; 47(1):12, 19.  
 [83] McMichael (2000) Vaccine 19 Erg. 1:S101-107.  
 [84] Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-6.  
 [85] WO02/34771.  
 [86] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii.  
 [87] Ferretti et al. (2001) PNAS USA 98:4658-4663.  
 [88] Kuroda et al. (2001) Lancet 357(9264):1225-1240; s. auch Seiten 1218-1219.  
 [89] J Toxicol Clin Toxicol (2001) 39:85-100.  
 [90] Demicheli et al. (1998) Vaccine 16:880-884.  
 [91] Stepanov et al. (1996) J Biotechnol 44:155-160.  
 [92] Ingram (2001) Trends Neurosci 24:305-307.  
 [93] Rosenberg (2001) Nature 411:380-384.  
 [94] Moingeon (2001) Vaccine 19:1305-1326.  
 [95] Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunology 9:271-283.  
 [96] Donnelly et al. (1997) Annu Rev Immunol 15:617-648.  
 [97] Scott-Taylor & Dalgie (2000) Expert Opin Investig Drugs 9:471-480.  
 [98] Apostolopoulos & Plebanski (2000) Curr Opin Mol Ther 2:441-447.  
 [99] Ilan (1999) Opin Mol Ther 1:116-120.  
 [100] Dubenski et al. (2000) Mol Med 6:723-732.  
 [101] Robinson & Pertmer (2000) Adv Virus Res 55:1-74.  
 [102] Donnelly et al. (2000) Am J Respir Crit Care Med 162(4 Pt 2):S190-193.  
 [103] Davis (1999) Mt. Sinai J. Med. 66:84-90.

### Patentansprüche

1. Modifiziertes Kapselsaccharid, umfassend eine Einheit der Formel (I):



wobei:

A eine Bindung, -C(O)- oder -OC(O)- ist;

R<sup>1</sup> ausgewählt ist aus H oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl;

L ein C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkylenrest ist;

M ein maskierter Aldehydrest ist.

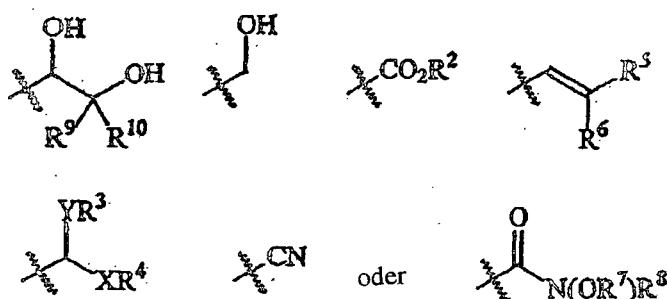
2. Modifiziertes Kapselsaccharid nach Anspruch 1, wobei A-OC(O)- ist.

3. Modifiziertes Kapselsaccharid nach Anspruch 1 oder 2, wobei R<sup>1</sup>H ist.

4. Modifiziertes Kapselsaccharid nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei L ein C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylenrest ist.

5. Modifiziertes Kapselsaccharid nach Anspruch 4, wobei L -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- ist.

6. Modifiziertes Kapselsaccharid nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der maskierte Aldehyd ausgewählt ist aus:



wobei:

$R^2$  ausgewählt ist aus H,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkyl,  $C_3$ - $C_{12}$ -Cycloalkyl,  $C_5$ - $C_{12}$ -Aryl oder  $C_{5-12}$ -Aryl- $C_{1-6}$ -alkyl;  
 $X$  und  $Y$  gleich oder voneinander verschieden sind und unabhängig ausgewählt sind aus O oder S;  
 $R^3$  und  $R^4$  unabhängig ausgewählt sind aus  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkyl,  $C_3$ - $C_{12}$ -Cycloalkyl,  $C_5$ - $C_{12}$ -Aryl oder  $C_{5-12}$ -Aryl- $C_{1-6}$ -alkyl; oder  $R^3$  und  $R^4$  verbunden sind, um einen  $C_3$ -,  $C_4$ -,  $C_5$ -,  $C_6$ -,  $C_7$ - oder  $C_8$ -Cycloalkylring, welcher die Heteroatome  $X$  und  $Y$  enthält, zu bilden;  
 $R^5$  und  $R^6$  unabhängig ausgewählt sind aus H,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkyl,  $C_3$ - $C_{12}$ -Cycloalkyl,  $C_5$ - $C_{12}$ -Aryl oder  $C_{5-12}$ -Aryl- $C_{1-6}$ -alkyl; oder  $R^5$  und  $R^6$  verbunden sind, um einen  $C_3$ - oder  $C_{12}$ -Cycloalkylring zu bilden;  
 $R^9$  und  $R^{10}$  unabhängig ausgewählt sind aus H,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkyl,  $C_3$ - $C_{12}$ -Cycloalkyl,  $C_5$ - $C_{12}$ -Aryl oder  $C_{5-12}$ -Aryl- $C_{1-6}$ -alkyl; oder  $R^9$  und  $R^{10}$  verbunden sind, um einen  $C_3$ - bis  $C_{12}$ -Cycloalkylring zu bilden; und  
 $R^7$  und  $R^8$  unabhängig ausgewählt sind aus  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkyl- oder  $C_3$ - $C_{12}$ -Cycloalkylresten.

7. Modifiziertes Kapselsaccharid nach Anspruch 6, wobei der maskierte Aldehyd  $-CH(OH)CH_2OH$  ist.

8. Modifiziertes Kapselsaccharid nach Anspruch 1 oder den Ansprüchen 3 bis 7, umfassend eine Einheit der Formel:

$-NH(CH_2)_3CH(OH)CH_2OH$ .

9. Modifiziertes Kapselsaccharid nach den Ansprüchen 1 bis 7, umfassend eine Einheit der Formel:

$-OC(O)NH(CH_2)_3CH(OH)CH_2OH$ .

10. Modifiziertes Kapselsaccharid, umfassend eine Einheit der Formel (II):

$-A-N(R^1)-L-C(O)H$  (II)

wobei A,  $R^1$  und L wie in einem der Ansprüche 1 bis 5 definiert sind.

11. Modifiziertes Kapselsaccharid nach Anspruch 10, wobei A- $OC(O)-$  ist.

12. Modifiziertes Kapselsaccharid nach Anspruch 10, umfassend eine Einheit der Formel:

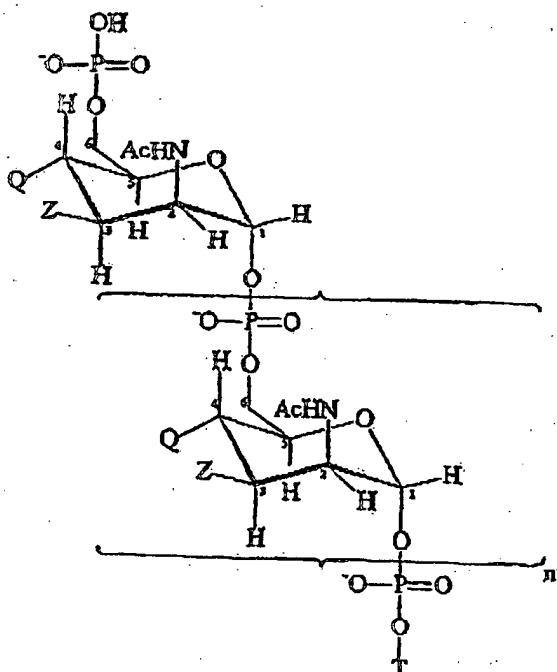
$-NH(CH_2)_3C(O)H$ .

13. Modifiziertes Kapselsaccharid nach den Ansprüchen 10 oder 11, umfassend eine Einheit der Formel:

$-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)H$ .

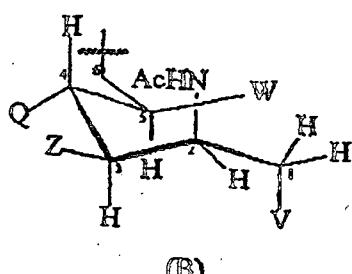
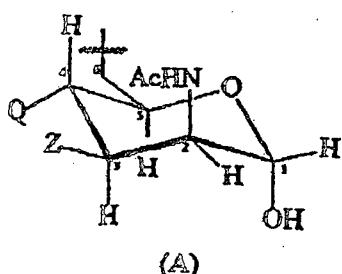
14. Modifiziertes Kapselsaccharid nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Kapselsaccharid Neisseria-meningitidis-Serogruppe-A-Saccharid ist.

15. Saccharid der Formel:



wobei:

T eines aus der Formel (A) oder (B) ist:



wobei:

n eine ganze Zahl von 1 bis 100 ist;

jeder Rest Z unabhängig ausgewählt ist aus -OH, -OAc, -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H;

jeder Rest Q unabhängig ausgewählt ist aus -OH, -OAc, -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H;

W ausgewählt ist aus -OH, -OAc, -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H;

V -N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H ist;

wobei R<sup>1</sup>, L und M wie in den Ansprüchen 1 bis 7 definiert sind und mit der Maßgabe, dass das Saccharid mindestens eine Einheit der Formel -N(R<sup>1</sup>)-L-M, -N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H, -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H umfasst.

16. Saccharid nach Anspruch 15, wobei n eine ganze Zahl von 15 bis 25 ist.

17. Saccharid nach Anspruch 15 oder 16, wobei T eines aus der Formel (A) ist.

18. Saccharid nach den Ansprüchen 15 bis 17, wobei Q und Z ein Gemisch aus OH- und OAc-Resten in im wesentlichen den gleichen relativen Anteilen wie in dem natürlichen Neisseria-meningitidis-Serogruppe-A-Saccharid sind, mit der Ausnahme, dass einer der Q- oder Z-Reste -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H ist.

19. Saccharid nach Anspruch 18, wobei einer der Q-Reste -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-M oder -OC(O)N(R<sup>1</sup>)-L-C(O)H ist.

20. Verfahren zur Modifizierung eines Kapselsaccharids, umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen eines Kapselsaccharids mit einem Hydroxylrest;

(b) Umsetzen des Hydroxylrests mit einem bifunktionellen Reagens in einem organischen Lösungsmittel;

(c) Umsetzen des Produkts von Schritt (b) mit einer Aminoverbindung der Formel (III):

wobei R<sup>1</sup>, L und M wie in einem der Ansprüche 1 bis 7 definiert sind.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Kapselsaccharid *Neisseria-meningitidis*-Serogruppe-A-Saccharid ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei das organische Lösungsmittel ein aprotisches Lösungsmittel ist.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das aprotische Lösungsmittel ausgewählt ist aus Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Formamid, Hexamethylphosphoramid (HMPA), Hexamethylphosphortriamid (HMTP), 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinon (DMPU) oder Dimethylacetamid (DMAC).

24. Verfahren nach den Ansprüchen 22 oder 23, wobei das aprotische Lösungsmittel DMSO ist.

25. Verfahren nach den Ansprüchen 20 bis 24, wobei das bifunktionelle Reagens ausgewählt ist aus 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI), Carbonyl-di-1,2,4-triazol (CDT), Carbonyl-di-1,2,3-benzotriazol (CDB), Diphenylcarbonat, Cyanogenbromid, Phosgen oder Triphosgen.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das bifunktionelle Reagens CDI ist.

27. Verfahren nach den Ansprüchen 20 bis 26, wobei die Aminoverbindung in Schritt (c) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH ist.

28. Verfahren nach den Ansprüchen 20 bis 27, welches ferner den Schritt (d) Demaskieren des maskierten Aldehydrests M, dabei Bereitstellen einer Aldehydverbindung, umfasst.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei der maskierte Aldehydrest M -CH(OH)CH<sub>2</sub>OH ist und der Demaskierungsschritt eine Periodatsspaltung ist.

30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, welches ferner den Schritt (e) Binden der Aldehydverbindung durch eine reduktive Aminierungsreaktion an ein Protein umfasst.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das Reduktionsmittel in der reduktiven Aminierungsreaktion NaBH<sub>3</sub>CN ist.

32. Verfahren zur Modifizierung eines *Neisseria-meningitidis*-Serogruppe-A-Saccharids, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen eines *Neisseria-meningitidis*-Serogruppe-A-Saccharids;
- (b) Umsetzen eines Hydroxylrests auf dem Saccharid mit CDI in einem DMSO-Lösungsmittel;
- (c) Umsetzen des Produkts des Schritts (b) mit H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH;
- (d) Spalten des Produkts des Schritts (c) mit Periodat, dabei Bereitstellen einer Aldehydverbindung; und
- (e) Binden der Aldehydverbindung des Schritts (d) durch eine reduktive Aminierungsreaktion unter Verwendung von NaBH<sub>3</sub>CN an ein Protein.

33. Saccharidprotein-Konjugat, wobei die Saccharid- und Proteineinheiten durch einen Rest der Formel (IV):

wobei A, R<sup>1</sup> und L wie in den Ansprüchen 1 bis 4 definiert sind, verbunden sind.

34. Saccharidprotein-Konjugat, wobei R<sup>1</sup> H ist, A -OC(O)- ist und L-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- ist.

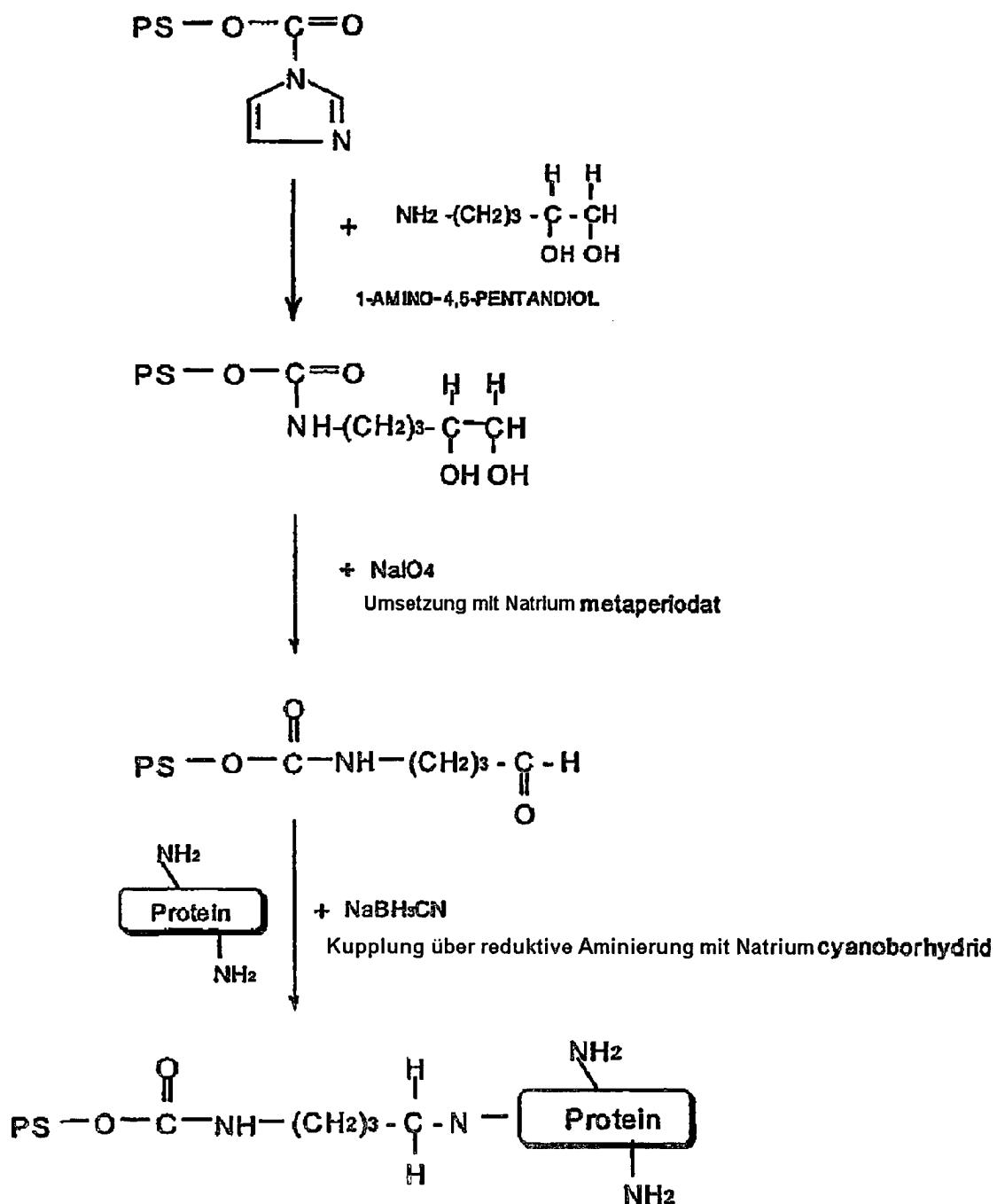
35. Konjugat nach Anspruch 33 oder 34, wobei das Saccharid *Neisseria-meningitidis*-Serogruppe-A-Saccharid ist.

36. Verfahren nach den Ansprüchen 30 bis 32 oder das Konjugat der Ansprüche 33 bis 35, wobei das Protein ein Bakterientoxin oder -toxoid ist.

37. Verfahren oder Konjugat nach Anspruch 36, wobei das Bakterientoxin oder -toxoid Diphterietoxin oder -toxoid ist.
38. Verfahren nach den Ansprüchen 30 bis 32 oder das Konjugat nach Anspruch 36, wobei das Baktieren-toxin oder -toxoid CRM<sub>197</sub> ist.
39. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Saccharidprotein-Konjugat gemäß einem der Ansprüche 33 bis 38 und/oder ein modifiziertes Saccharid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 und (b) einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
40. Zusammensetzung nach Anspruch 39, ferner umfassend ein Impfstoffadjuvans.
41. Zusammensetzung nach Anspruch 40, welche ein Impfstoff gegen eine durch *Neisseria meningitidis* verursachte Erkrankung ist.
42. Konjugat nach einem der Ansprüche 33 bis 38 oder Saccharid nach den Ansprüchen 1 bis 19 zur Verwendung als ein Medikament.
43. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 33 bis 38 oder eines Saccharids nach den Ansprüchen 1 bis 19 zur Herstellung eines Medikaments zur Vorbeugung oder Behandlung einer durch ein oder mehrere Kapselbakterien verursachten Erkrankung.
44. Verwendung nach Anspruch 43, wobei die Erkrankung bakterielle Meningitis ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

**FIGUR 1**

**FIGUR 2**

