



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

- PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL -

06-129107

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

DERIVADOS DE POLISACARIDOS Y SUS USOS EN LA INDUCCION DE UNA
RESPUESTA INMUNE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 39/095

71. SOLICITANTE

CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND

DOMICILIO

747 52nd Street, Oakland, CA 94609, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

22. BOGOTÁ, D. C.,

26 DIC. 2006

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

Superintendencia de Industria y Comercio
Rad: 06-129107- 00000-0000
Fec: 2008-12-28 14:58:31 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eve: 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION
Folios: 218

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND
Dirección: 747 82nd Street, Oakland, CA 94608
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Nacionalidad o Domicilio: Oakland, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Lugar de Constitución: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

Número: _____ Cual: _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 84A No. 7A-09

Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0706

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número: 39'779.654 TPA 70,819

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: GREGORY R. MOE, DAN M. GRANOFF

Dirección: 42 Steuben Way, Alameda, CA 94602, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, 1085
Creston Road, Berkeley, CA 94708, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSES

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/022690

Fecha: 23/08/2005

Publicación Internacional No. WO 2006/002402

Fecha: 05/01/2006

⑥

Título (84)

DERIVADOS DE POLISACARIDOS Y SUS USOS EN LA INDUCCION DE UNA
RESPUESTA INMUNE

⑦

Clasificación Internacional (61)

CIPSI 2006

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

US

23/08/2004

60/682,672

⑨

Comprobante de pago No.

06-92364

Fecha

Diciembre 1 de 2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

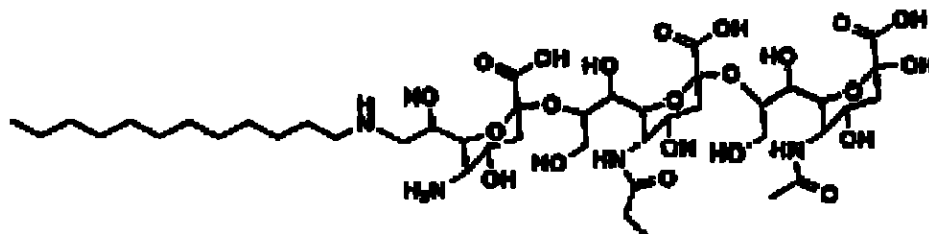
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Tarjeta Propietario, Tarjeta Temática y Extracto para la Publicación y Formato PCT/IB/304

11

FIGURA CARACTERISTICA:



Masa Exacta: 1000.5

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

C.C. No. 38779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

26 DIC. 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-129107- -00000-0000
Fec: 2006-12-28 14:58:31 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYH
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRFSPNTACION Folios: 218

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 92,364
FECHA : DICIEMBRE 1 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	50962503	01/12/2006	3,296,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 January 2006 (05.01.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/002402 A2(51) International Patent Classification:
C08B 37/00 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/US2005/022590

(22) International Filing Date: 23 June 2005 (23.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/582,672 23 June 2004 (23.06.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND [US/US]; 747 52nd Street, Oakland, CA 94609 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MOE, Gregory, R. [US/US]; 42 Steuben Way, Alameda, California 94502 (US). GRANOFF, Dan, M. [US/US]; 1085 Creston Road, Berkeley, CA 95708 (US).

(74) Agent: FRANCIS, Carol, L.; Bozicevic, Field & Francis LLP, 1900 University Avenue, Suite 200, East Palo Alto, CA 94303 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

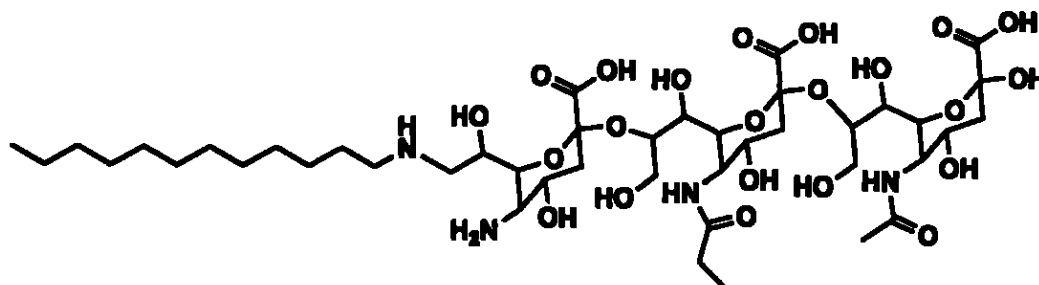
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: POLYSACCHARIDE DERIVATIVES AND USES IN INDUCTION OF AN IMMUNE RESPONSE



Exact Mass: 1000.5

(57) Abstract: The present invention generally provides compositions comprising a polysaccharide derivative, and methods of their preparation and use for the prevention or treatment of diseases caused by *Neisseria meningitidis* bacteria, particularly group B (NmB) strains, and by *E. coli* K1. The invention provides a de-N-acetylated PS derivative in which one or more residues of the PS has been modified by de-N-acetylation. The invention also includes derivatives in which one or more of the N-acetyl groups of PS containing de-N-acetylated PS are replaced with other N-acyl groups, usually a lower acyl group of C₂ - C₃. Further, the invention includes de-N-acetylated PS derivatives containing long chain hydrocarbons, as well as conjugates in which the de-N-acetylated PS derivative is linked to a carrier, e.g., a carrier protein.

WO 2006/002402 A2

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

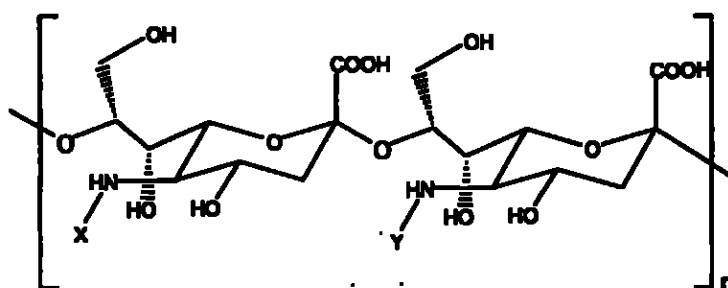
1. A composition comprising an adjuvant and a polysaccharide (PS) derivative, the PS derivative comprising a least one dimer of first and second residues of a sialic acid or sialic acid derivative, wherein:

the first residue is N-acetylated and the second residue comprises a free amine group,
the first residue comprises a free amine group and the second residue is N-acetylated,

or

the first and second residues comprise free amine groups.

2. A composition comprising a polysaccharide (PS) derivative comprising a structure represented by the formula:



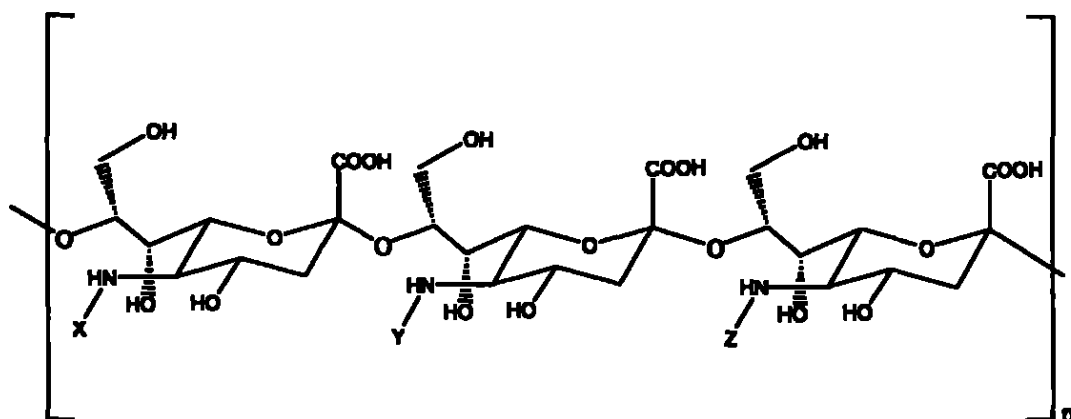
wherein

X and Y are independently H or an acetyl group; and

n is at least 1;

wherein the PS derivative is conjugated to a carrier protein or further comprises a sialic acid residue having an alkyl secondary amine at a non-reducing end of the PS derivative.

3. A composition comprising a polysaccharide (PS) derivative comprising a structure represented by the formula:



wherein

X, Y and Z are independently H or a saturated acyl group, with the proviso that at least one of X, Y, and Z is H, at least one of X, Y, and Z is a saturated acyl group; and

n is at least one;

wherein the PS derivative is optionally conjugated to a carrier protein or further comprises a sialic acid residue having an alkyl secondary amine at a non-reducing end of the PS derivative.

4. The composition of claim 3, wherein when two of X, Y, and Z are acyl groups, the acyl groups are different acyl groups.

5. The composition of claim 4, wherein at least one of X, Y, and Z is an acetyl group and at least one of X, Y, and Z is a propionyl group.

6. The composition of claim 3, wherein when X is H, Y and Z are different acyl groups; when X is an acyl group, Y and Z are different moieties and are either H or an acyl group; and when X is an acyl group, Y and Z are different moieties and are either H or an acyl group.

7. The composition of claim 6, wherein
when X is H, Y and Z are different acyl groups selected from acetyl and propionyl;
when X is an acetyl group, Y and Z are different moieties and are either H or a propionyl group; and

when X is a propionyl group, Y and Z are different moieties and are either H or an acetyl group.

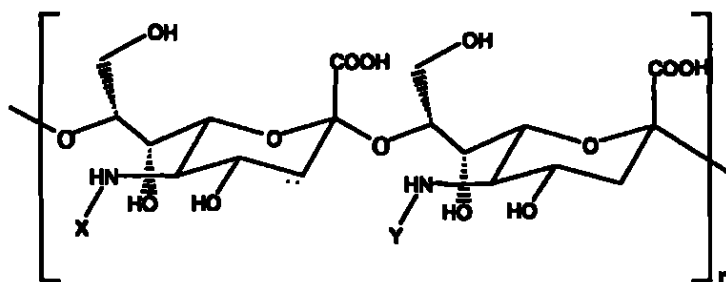
8. The composition of claim 3, wherein the PS derivative comprises an amidated sialic acid residue having an alkyl secondary amine at a non-reducing terminus of the PS derivative.

9. The composition of claim 3, wherein the PS derivative is conjugated to a carrier protein.

10. The compositions of any one of claims 1-3, wherein the PS derivative comprises a sialic acid residue derivative having a lactone moiety or a cyclic secondary amine.

11. The compositions of any one of claims 1-3, wherein the PS derivative is a heteropolymeric compound.

12. A composition comprising a polysaccharide (PS) derivative comprising a structure represented by the formula:



wherein

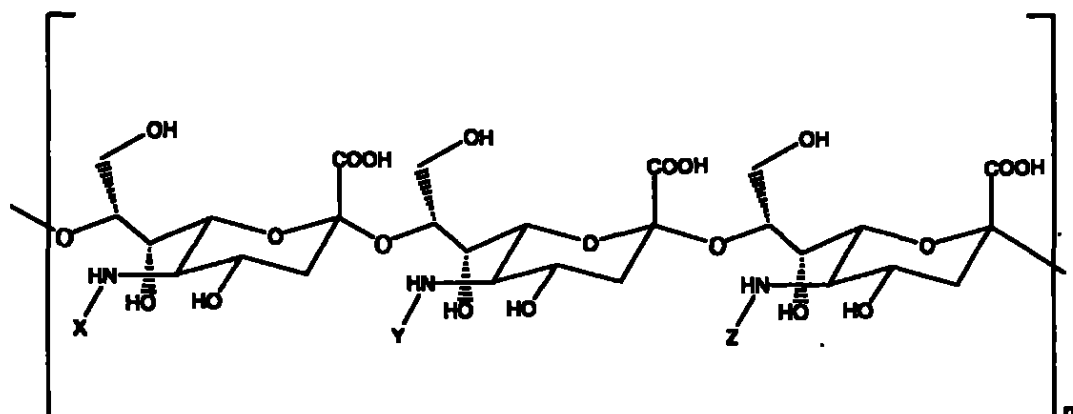
X and Y are independently an amine protecting group, or a saturated or unsaturated acyl group; and

n is at least 1;

wherein the PS derivative is optionally further comprises a carrier protein conjugated to a sialic acid residue of the PS derivative, or optionally further comprises an amidated sialic acid residue having an alkyl secondary amine at a non-reducing end of the PS derivative.

13. The composition of claim 12, wherein the acyl group is a saturated acyl group and acetyl or propionyl.

14. The composition of claim 12, wherein the PS derivative comprises a structure represented by the formula:



wherein

X, Y and Z are independently an amine protecting group, with the proviso that at least one of X, Y, and Z is an amine protecting group and at least one of X, Y, and Z is a saturated or unsaturated acyl group; and

n is at least one.

15. The composition of claim 14, wherein the acyl group is a saturated acyl group and acetyl or propionyl.

16. A method of immunizing a subject, comprising:

administering to a subject an amount of a PS derivative of any of claims 1-11 in an amount effective to elicit an immune response;

wherein said administering is effective to elicit an immune response in the subject against *Neisseria meningitidis* group B.

17. A method of immunizing a subject, comprising:

administering to a subject an amount of a PS derivative of any of claims 1-11 in an amount effective to elicit an immune response;

wherein said administering is effective to elicit an immune response in the subject against *Escherichia coli* K1.

18. A method for providing passive protection against a bacterial infection, the method comprising:

administering to a subject bactericidal antibodies elicited by immunization of a host with the de-N-acetylated PS derivative of any of claims 1-11;

wherein said administering provides for protection of the subject against *Neisseria meningitidis* group B or against *Escherichia coli* K1.

19. A method of producing a polysaccharide (PS) derivative, the method comprising: reacting an at least partially de-N-acetylated PS molecule with a mixture comprising an amine protecting reagent and an acylating reagent in the presence of an organic solvent;

wherein said reacting produces a protected PS derivative having an amine protecting group and an N-acylated group.

20. A protected polysaccharide (PS) derivative produced by the method of claim 19.

21. The method of claim 19, further comprising:

treating the protected PS derivative under conditions to remove the amine protecting group;

wherein a PS derivative is produced.

22. The method of claim 19, wherein the method further comprises:

conjugating the protected PS derivative to a carrier protein to produce a conjugated protected PS derivative; and

treating the conjugated protected PS derivative under conditions to remove the amine protecting group;

wherein a conjugated PS derivative is produced.

23. The method of claim 19, wherein the method further comprises:

reacting the protected PS derivative with an N-acyl amine reagent to produce an amidated protected PS derivative having an amidated sialic acid residue having an alkyl secondary amine; and

treating the amidated protected PS derivative under conditions to remove the removing the amine protecting group;

wherein a PS derivative having an amidated sialic acid residue having an alkyl secondary amine at is produced.

24. A method of producing a polysaccharide (PS) derivative, the method comprising: culturing a *Neisseria meningitidis* Group B bacterium in a growth medium comprising an N-acyl-mannosamine and an amine-protected mannosamine, wherein the bacterium is deficient in production of capsule polysaccharide in the absence of supplemental mannosamine;

wherein said culturing provides for production of a protected PS derivative having an amine protecting group and an N-acylated group.

25. The method of 24, wherein the method further comprises:

conjugating the protected PS derivative to a carrier protein to produce a conjugated protected PS derivative; and

treating the conjugated protected PS derivative under conditions to remove the amine protecting group;

wherein a conjugated PS derivative is produced.

26. The method of claim 24, wherein the method further comprises:

reacting the protected PS derivative with an N-acyl amine reagent to produce an amidated protected PS derivative having an amidated sialic acid residue having an alkyl secondary amine; and

treating the amidated protected PS derivative under conditions to remove the removing the amine protecting group;

wherein a PS derivative having an amidated sialic acid residue having an alkyl secondary amine at is produced.

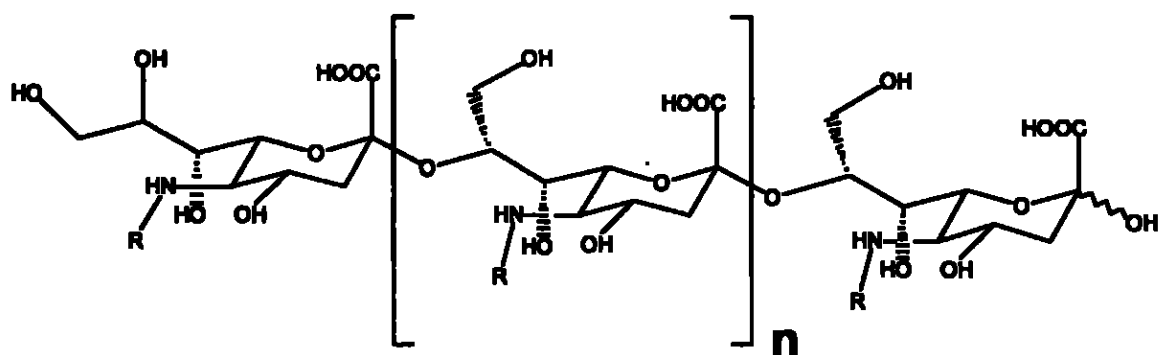
27. A method for identifying a polysialic acid (PSA) epitope bound by an antibody, the method comprising:

contacting a PSA derivative with an antibody, said contacting being under conditions suitable for formation of antigen-antibody complexes of the antibody and the PS derivative; and

contacting the antigen-antibody complex with a sialidase under conditions suitable for removal of sialidase-accessible PSA derivative residues of the antigen-antibody complex;

wherein PSA derivative residues remaining in the antigen-antibody complex following sialidase treatment define an epitope bound by the antibody.

FIGURE 1



2/18

FIGURE 2

Fine antigenic specificities of the anti-N-Pr NmB PS mAbs ("SEAM") that have minimal or no reactivity with human polysialic acid antigens^a.

mAb	IgG subclass	ELISA reactivity to N-Ac NmB PS ^b	ELISA Inhibition of	
			binding by N-Pr NmB PS oligosaccharides ^c	Cross-reactivity with human PSA ^d
SEAM 2	3	0	0	0
SEAM 3	2b	0	+++	0
SEAM 12	2a	++	0	+
SEAM 18	2b	+++	+++	+

^aData taken from Granoff and Moe, US Pat. No. 6,048,527.

^bAb binding to N-Ac NmB PS: 0, OD <0.15; +, OD = 0.15-0.5; ++, OD = 0.5-1.0; +++, OD > 1.0 when tested at 5-25 µg/ml of Ab by ELISA.

^cInhibition of Ab binding to N-Pr NmB PS in an ELISA by soluble N-Pr NmB PS (Dp < 6; average Dp = 3.8): 0, < 20%; +, 21%-48%; ++, 49%-74%; +++, 75%-100% inhibition when tested with an [Ab] giving an OD = 0.5 in 30 m.

^dBinding to polysialic acid on CHP-134 neuroblastoma cells as measured by indirect fluorescence flow cytometry: 0, no binding activity to PSA when tested at 100 µg/ml of Ab; ++, binding activity detected at 10 µg/ml of Ab; +, binding activity detected at 100 µg/ml but not 10 µg/ml.

FIGURE 3

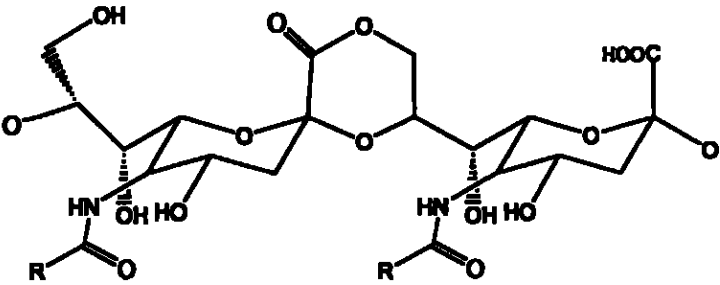


FIGURE 4

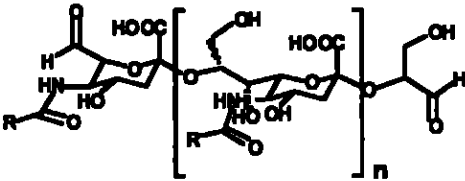


FIGURE 5
Summary of inhibition of anti-N-Pr NmB PS mAb (SEAM mAb) binding to N-Pr NmB PS by PS derivatives in ELISA^a.

Inhibitor	SEAM mAb			
	2	3	12	18
NmB PS ^b	>100	>100	>100	>100
Colominic acid	>100	>100	>100	>100
Deacetyl colominic acid	>100	0.8	>100	1.7
N-Ac NmB PS	>100	0.32	1.2	0.3
Ox N-Ac NmB PS	>100	10.1	>100	12.6
H ⁺ N-Ac NmB PS	>100	1.9	>100	>100
Ox H ⁺ N-Ac NmB PS	>100	13.4	>100	>100
N-Pr NmB PS	0.1	0.004	0.004	0.001
Ox N-Pr NmB PS	<0.02	0.07	<0.02	<0.02
H ⁺ N-Pr NmB PS	1	0.03	0.05	0.03
Ox H ⁺ N-Pr NmB PS	1.5	2.2	1.3	1.8

^aConcentrations in µg/ml inhibiting 50% of maximum OD at 405 nm in 30 min.

^bIsolated from *N. meningitidis* group B bacteria as described in Constantino et al. (1999 Vaccine 17:1251). The NmB PS used in this assay completely inhibits binding of anti-NmB PS mAb 2-1-B, which binds to both N-Ac NmB PS and N-Pr NmB PS in ELISA, at concentrations less than 0.1 µg/ml (data not shown).

5/18

FIGURE 6

Inhibition of complement mediated bactericidal activity of anti-N-Pr NmB PS mAbs as measured against *N. meningitidis* group B strain 8047.

Inhibitor	Anti-N-Pr NmB PS mAb ^a			
	SEAM 2	SEAM 3	SEAM 12	SEAM 18
Native N-Ac NmB PS ^b	>50	>14	>12	>50
De-N-Acetyl NmB PS	>50	4	>50	>50
Resynthesized N-Acetyl NmB PS ^d	>50	0.6	>50	12
Synthesized N-Propionyl NmB PS ^e	0.03	0.2	0.2	<0.04

^aConcentrations of NmB PS derivative (µg/ml) that result in inhibition of bactericidal activity of the mAbs against strain 8047. Inhibition was defined by 50% survival of bacteria when incubated with complement and a concentration of mAb that gives 0% survival (that is, 100% killing) in the absence of the inhibitor. The CFU/ml at 60 min was > 200% of the CFU/ml at time 0. Control mAb anti-capsular 2-I-B was inhibited by NmB PS but not by any of the other derivatives including re-synthesized N-Ac NmB PS and a control anti-PorA P1.2 mAb was not inhibited by NmB PS or any of the NmB PS derivatives. None of the mAbs was inhibited by 50 µg/ml of *N. meningitidis* group A polysaccharide.

^bIsolated from *N. meningitidis* group B bacteria as described in Constantino et al. (1999 Vaccine 17:1251).

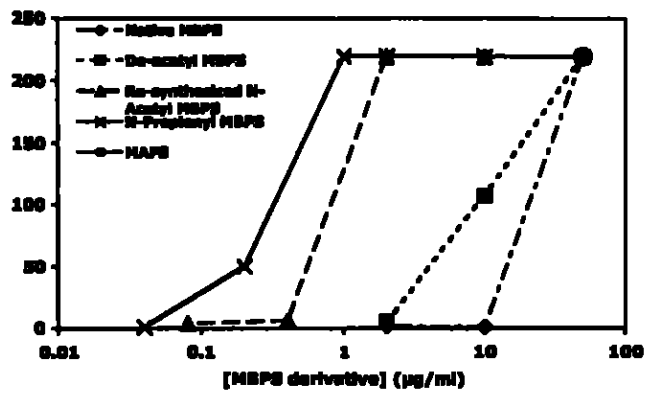
^cPrepared from *E. coli* K1. Colominic acid is chemically and immunologically identical to that of NmB PS (Rohr et al. 1980 J Biol Chem 255:2332; Bhattacharjee et al. 1975 J Biol Chem 250:1926) except that some *E. coli* K1 strains express C7 or C9 O-acetylated polysaccharide (Orskov et al. 1979 J Exp Med 149:669).

^dRe-synthesized N-Ac NmB PS that has been de-acetylated and re-N-acetylated as described in Example 1.

^eNmB PS that has been de-acetylated and N-propionylated as described in Example 1.

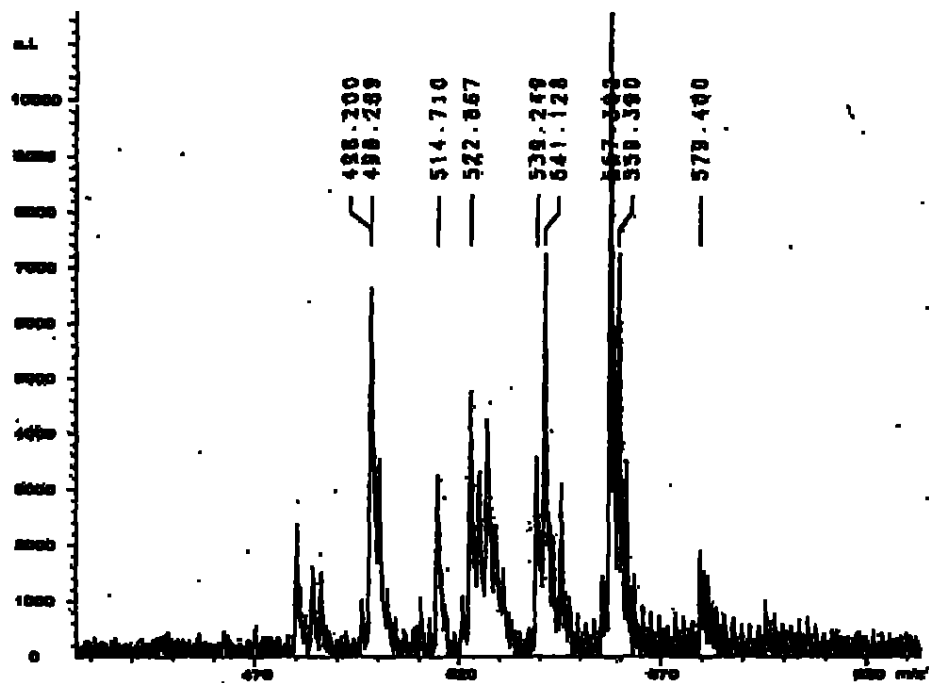
6/18

FIGURE 7



7/18

FIGURE 8



8/18

FIGURE 9

SUMMARY OF MS DATA FOR POLYSACCHARIDE SELECTED BY SEAM
MABS

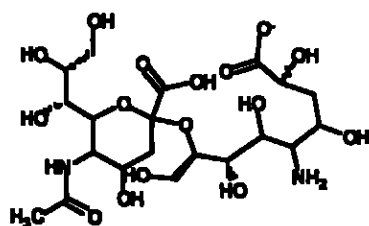
			Selecting "SEAM" monoclonal antibody			
Ion putative structure	Calculated mass (Daltons)		2	3	12	18
	Monoisotopic	Average	Observed mass/charge			
[II + Na ⁺] ⁻	579.16	579.46	579.378	579.400	579.482	1. 579.328
[I]	559.20	559.50	559.290	559.390	559.314	559.525
[II] ⁻	557.18	557.48	557.289	557.392	557.403	557.305
[III or IV] ⁻	541.17	541.45	541.162	541.128	541.168	-
[V]	539.17	539.46	539.169	539.249	539.157	-
[VI]	523.18	523.47	522.731	522.867	522.813	-
[VII] ⁻	515.17	515.44	514.540	514.710	514.616	-
[II-CH ₂ O] ⁻	527.17	527.45	-	-	526.975	526.991
[Mixture of VII, VIII] ⁻	499.18, 497.16		498.219	498.289	498.273	-

The estimate of error for observed masses is $\pm 0.1\%$.

9/18

FIGURE 10

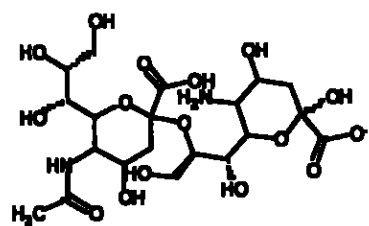
Structure I



$C_{20}H_{25}N_2O_{16}^-$
Exact Mass: 669.20
Mol. Wt.: 669.60
C, 42.93; H, 6.31; N, 5.01; O, 46.75

FIGURE 11

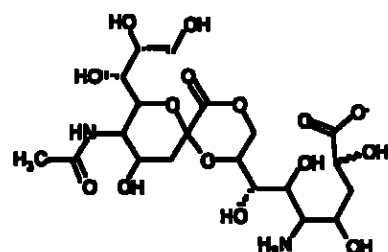
Structure II



$C_{20}H_{25}N_2O_{16}^-$
Exact Mass: 667.19
Mol. Wt.: 667.48
C, 43.09; H, 6.97; N, 5.03; O, 45.92

FIGURE 12

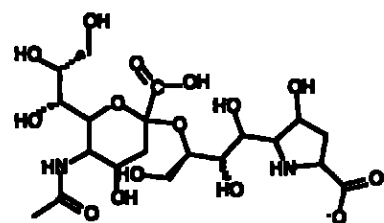
Structure III



$C_{20}H_{25}N_2O_{16}^-$
Exact Mass: 641.19
Mol. Wt.: 641.48
C, 44.38; H, 6.14; N, 5.17; O, 44.32

FIGURE 13

Structure IV

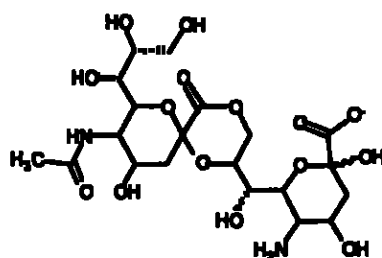


$C_{20}H_{25}N_2O_{16}^-$
Exact Mass: 641.19
Mol. Wt.: 641.48
C, 44.38; H, 6.14; N, 5.17; O, 44.32

10/18

FIGURE 14

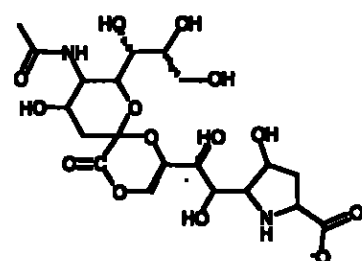
Structure V



$C_{29}H_{31}N_2O_{15}^-$
Exact Mass: 539.17
Mol. Wt.: 539.48
C, 44.53; H, 5.79; N, 5.19; O, 44.49

FIGURE 15

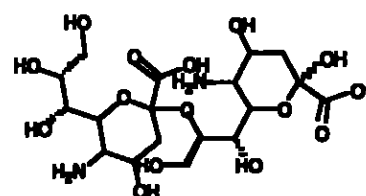
Structure VI



$C_{29}H_{31}N_2O_{14}^-$
Exact Mass: 523.18
Mol. Wt.: 523.47
C, 48.89; H, 5.57; N, 5.35; O, 42.79

FIGURE 16

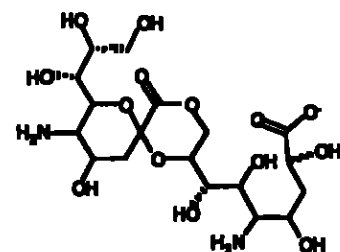
Structure VII



$C_{19}H_{21}N_2O_{15}^-$
Exact Mass: 515.17
Mol. Wt.: 515.44
C, 41.94; H, 6.08; N, 5.43; O, 48.56

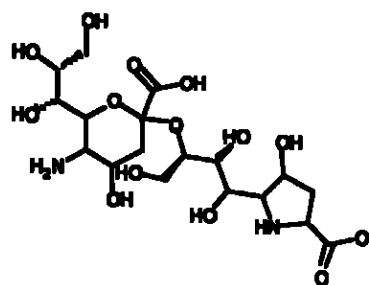
FIGURE 17

Structure VI

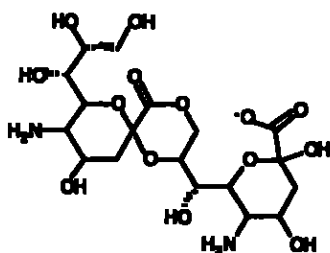


$C_{19}H_{21}N_2O_{14}^-$
Exact Mass: 499.18
Mol. Wt.: 499.44
C, 43.29; H, 6.26; N, 5.81; O, 44.65

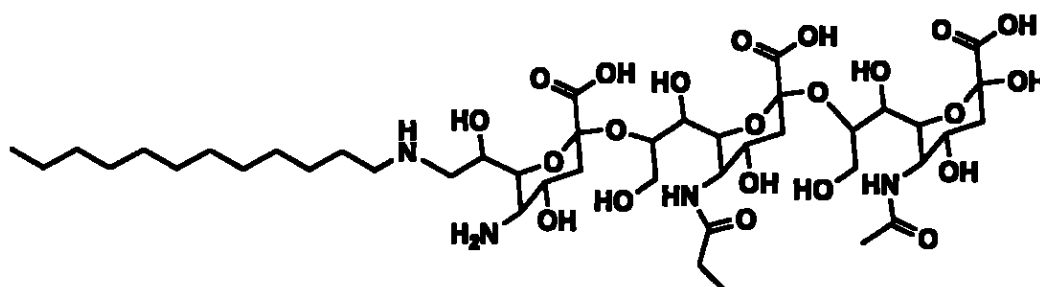
11/18

FIGURE 18**Structure VII**

$C_{18}H_{31}N_2O_{14}^-$
Exact Mass: 499.18
Mol. Wt.: 499.44
C, 43.29; H, 6.26; N, 5.61; O, 44.85

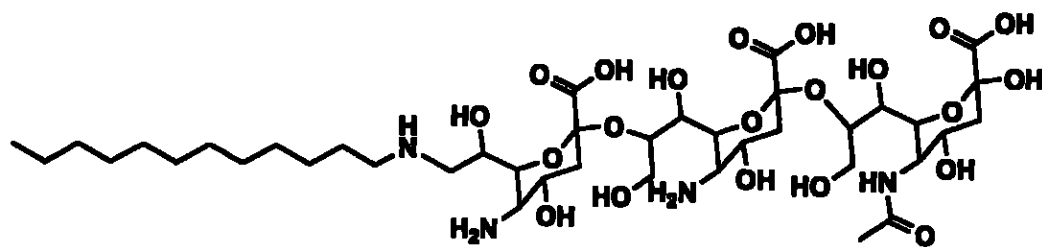
FIGURE 19**Structure VIII**

$C_{18}H_{31}N_2O_{14}^-$
Exact Mass: 497.18
Mol. Wt.: 497.43
C, 43.46; H, 5.88; N, 5.83; O, 45.03

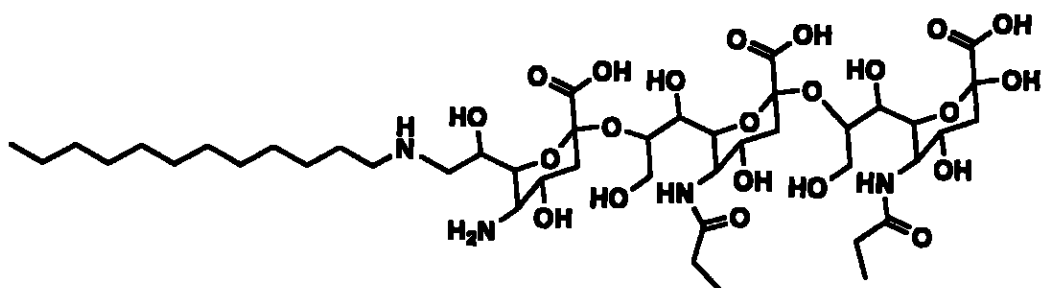
FIGURE 20

Exact Mass: 1000.5

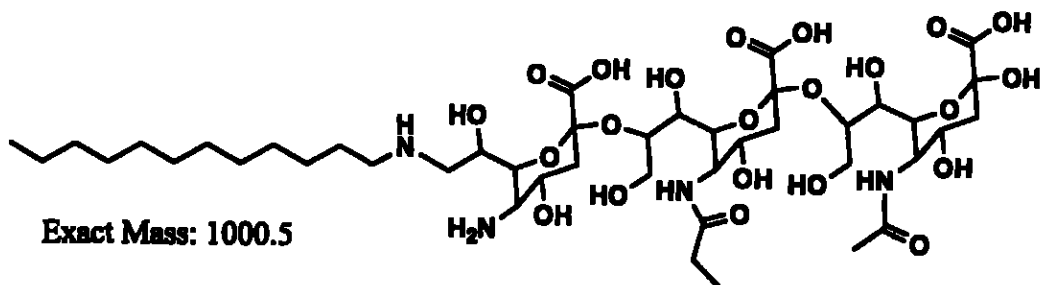
12/18

FIGURE 21

Exact Mass: 944.47

FIGURE 22

Exact Mass: 1014.51

FIGURE 23

Exact Mass: 1000.5

13/18

FIGURE 24

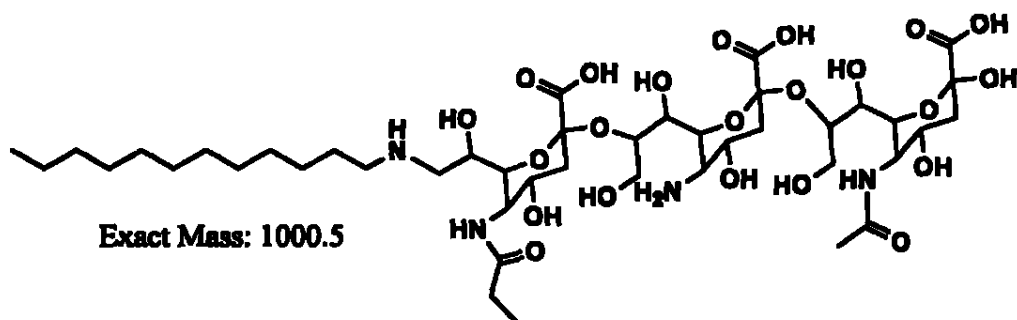


FIGURE 25

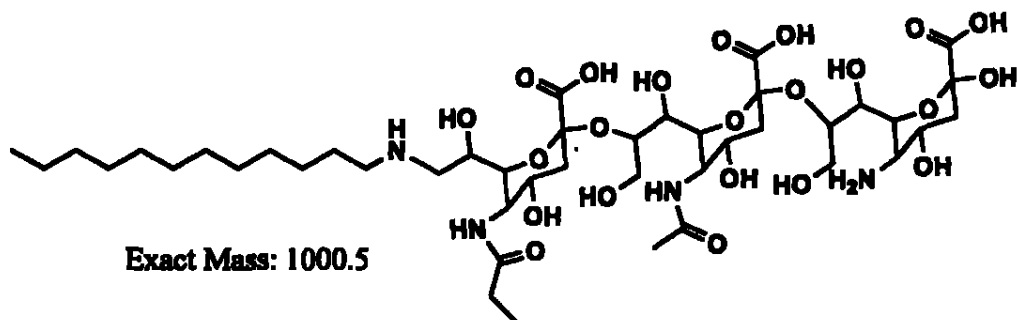


FIGURE 26

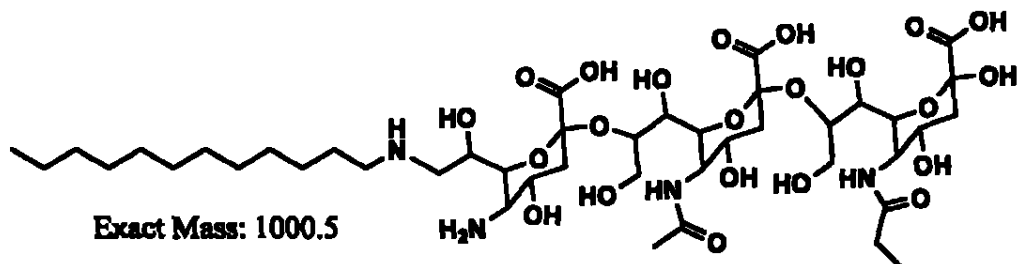
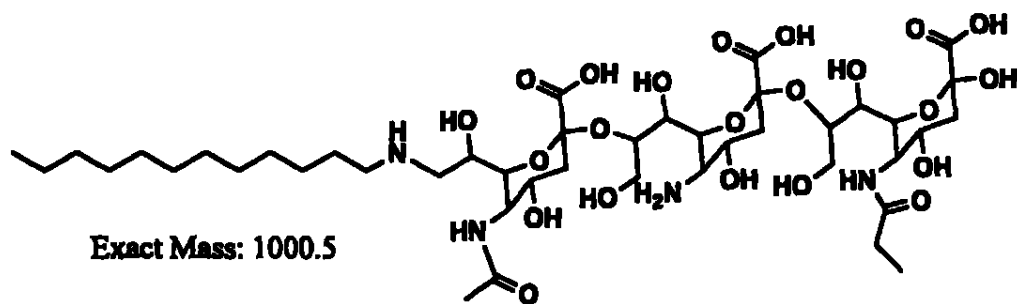


FIGURE 27



14/18

FIGURE 28

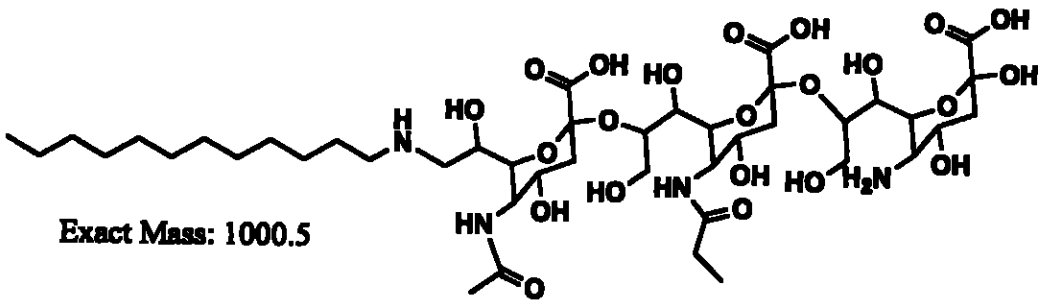


FIGURE 29

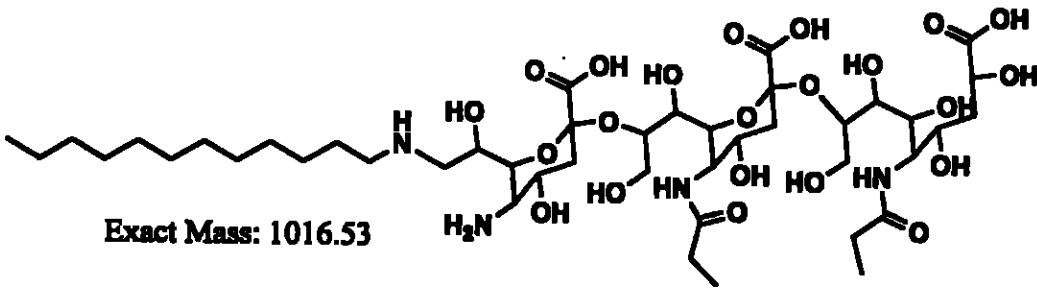


FIGURE 30

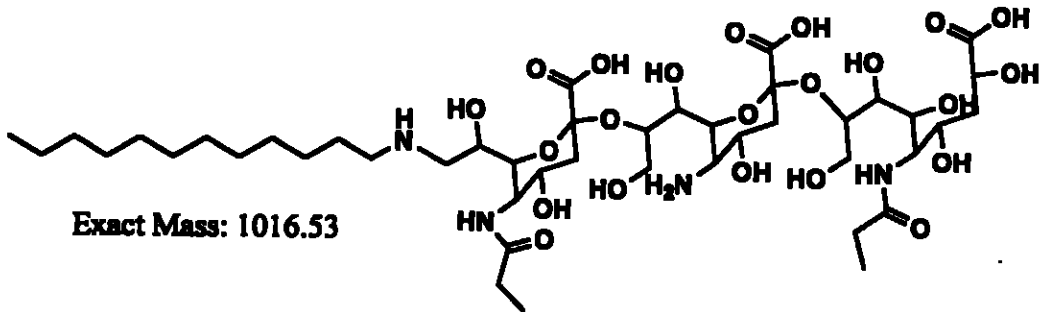
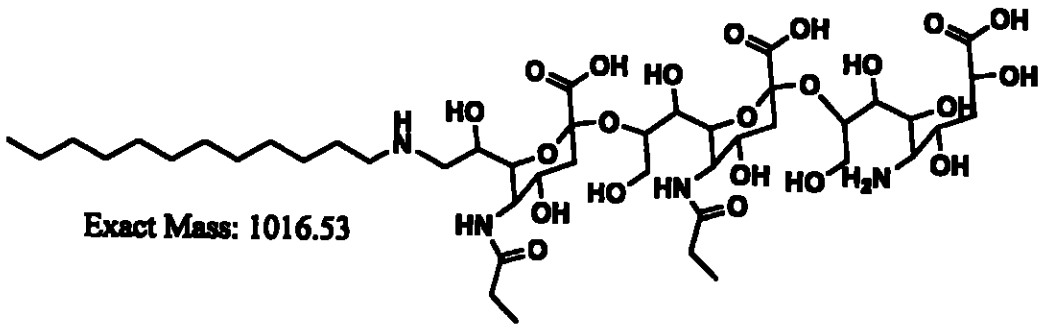


FIGURE 31



15/18

FIGURE 32

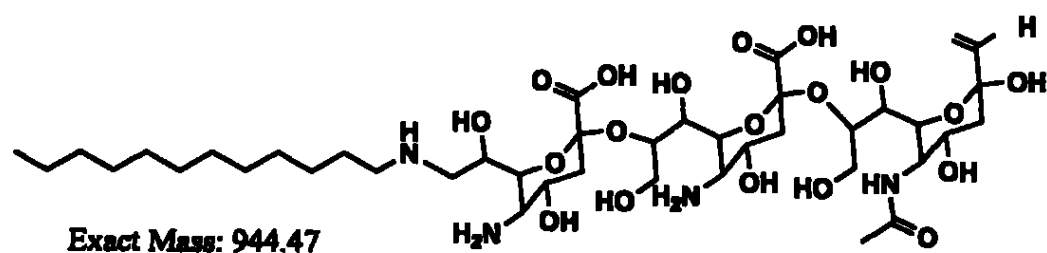


FIGURE 33

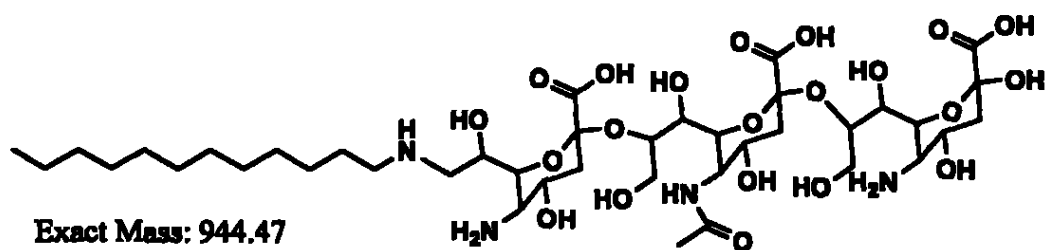


FIGURE 34

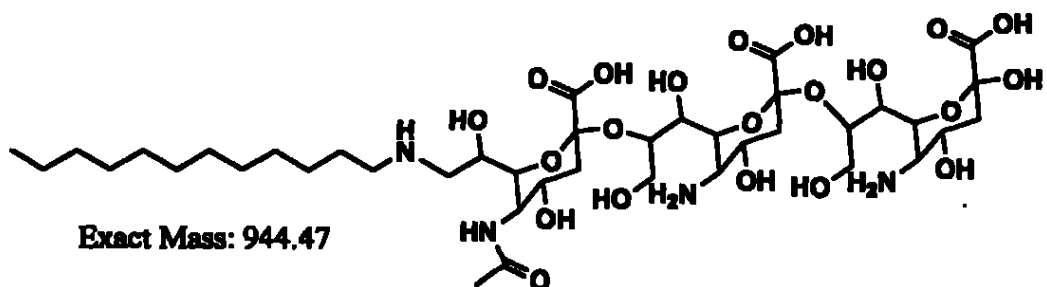


FIGURE 35

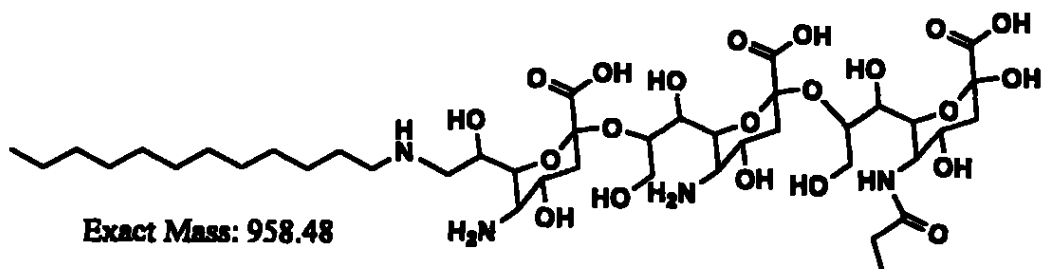


Figure 38
Concentration for mAb binding to dodecylamine PS antigens as determined by direct binding ELISA^{a,b}

SEAM mAb	Non- reducing end MBPS	Non-reducing end dodecyl Re- N-Ac MBOS/PS		Non-reducing end dodecyl N-Pr MBOS/PS	
	Dp>14	OS, Dp<7	PS, Dp>14	OS, Dp<7	PS, Dp>14
2	>10	>10	>10	>10	0.94
3	>10	0.05	0.05	0.03	0.03
12	0.52	0.37	0.29	0.11	0.01
18	>10	>10	>10	0.87	0.05
35	>10	>10	>10	5.73	0.5

^aConcentration of mAb in micrograms/ml required to give an OD₄₀₅ nm equal to 0.5 in 1 hr by ELISA with the non-reducing end dodecylamine MBPS derivative coated on the plate and the bound mAb detected using goat anti-mouse IgG, M, A alkaline phosphatase conjugate secondary antibody as described in the text.

^bPreparation and composition of MBPS derivatives are as described in the text. Colominic acid was used to prepare this derivative. Since the colominic acid is from an *E. coli* K1 strain that does not O-acetylate the hydroxyl groups on C7 and C9, the polysaccharide is chemically identical to meningococcal group B polysaccharide (MBPS). N-Pr, N-propionyl; N-Ac, N-acetyl; OS oligosaccharide; PS, polysaccharide; Dp, degree of polymerization.

Figure 39

Concentration for mAb binding to BSA-PS derivative conjugate antigens as determined by direct binding ELISA^{a,b}

SEAM mAb	Non- reducing end MBPS	Non-reducing end dodecyl Re- N-Ac MBOS/PS		Non-reducing end dodecyl N-Pr MBOS/PS	
	Dp>14	OS, Dp<7	PS, Dp>14	OS, Dp<7	PS, Dp>14
2	>10	>10	>10	4.6	3.8
3	>10	0.012	0.014	0.018	0.016
12	0.52	0.18	0.14	0.01	0.02
18	>10	>10	>10	0.07	0.007
35	>10	>10	>10	33	0.23

^aConcentration of mAb in micrograms/ml required to give an OD₄₀₅ nm equal to 0.5 in 1 hr by ELISA with the non-reducing end BSA MBPS derivative coated on the plate and the bound mAb detected using goat anti-mouse IgG, M, A alkaline phosphatase conjugate secondary antibody as described in the text.

^bPreparation and composition of MBPS derivatives are as described in the text. Colominic acid was used to prepare this derivative. Since the colominic acid is from an *E. coli* K1 strain that does not O-acetylate the hydroxyl groups on C7 and C9, the polysaccharide is chemically identical to meningococcal group B polysaccharide (MBPS). N-Pr, N-propionyl; N-Ac, N-acetyl; OS oligosaccharide; PS, polysaccharide; Dp, degree of polymerization.

18/18

22

DERIVADOS DE POLISACÁRIDOS Y SUS USOS EN LA INDUCCIÓN
DE UNA RESPUESTA INMUNE

DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN

5 PATROCINADA FEDERALMENTE

Esta invención fue realizada con el patrocinio gubernamental bajo las concesiones números AI466464 y AI45642 otorgadas por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas) y el National
10 Institute of Health (Instituto Nacional de la Salud). El gobierno puede tener ciertos derechos sobre esta invención.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a derivados de polisacáridos, a composiciones que los contienen, y a métodos para su uso.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Neisseria meningitidis, una bacteria Gram-negativa, es un patógeno humano principal que causa meningitis y sepsis bacterianas. Las tasas de ataque y patología son las más altas en los niños menores a 2 años de edad. Cinco grupos capsulares
20 principales representan casi todos los aislados productores de enfermedad. Éstos se definen por medio de diferentes cápsulas de polisacáridos designadas como A, B, C, Y, y W-135. Existen vacunas disponibles para la prevención de las enfermedades causadas por los organismos del grupo A, C, Y, y W-135. Sin embargo, no existen
25 vacunas disponibles para la prevención de las enfermedades

causadas por las cepas del grupo B (referidas posteriormente en la presente como "NmB"), que corresponden al 50 por ciento o más de todos los casos de enfermedades meningocócicas en niños en Estados Unidos y Europa (Jones D., en "Meningococcal Disease",
5 John Wiley & Sons, Nueva York, 1995).

El polisacárido capsular meningocócico grupo B (referido aquí como polisacárido capsular NmB o "NmB PS") se compone de un polímero homolineal de ácido alfa(2→8)N-acetil-neuramínico (poli-ácido siálico; referido posteriormente en la presente como "PSA");
10 Este polisacárido capsular se conserva entre todas las cepas NmB, y también se encuentra en la K1 patógena de *Escherichia coli*. El NmB PS es químicamente idéntico al poli-ácido siálico que es expresado abundantemente por los tejidos fetales incluyendo el cerebro, el corazón y el riñón.

15 La cápsula del Grupo B es un importante determinante de la virulencia. Por ejemplo los mutantes que son deficientes en la expresión capsular son sensibles al suero y no patógenos (Stephens 1991, Infect. Immun. 59: 4097). La evidencia también indica que el anticuerpo de suero para el polisacárido del Grupo B también
20 confiere protección contra las enfermedades mediante la activación de la bacteriólisis y/u opsonización mediada por el complemento (Griffiss, J. M., en "Meningococcal Disease," John Wiley & Sons, Nueva York, 1995).

Sin embargo, los esfuerzos para emplear el polisacárido
25 capsular NmB como un componente de vacuna han sido opacados

por su poca inmunogenicidad (Wyle y colaboradores, 1972, *J. Infect. Dis.* 126: 514-522; Zollinger, y colaboradores, 1979, *J. Clin. Invest.* 63: 836-834), aun cuando se conjuguen con una proteína portadora (Devi y colaboradores, 1997, *Infect. Immun.* 65: 1045; Jennings y
5 colaboradores, 1981, *J. Immunol.* 127: 1011). La baja inmunogenicidad se atribuye a la tolerancia inmunológica inducida por la exposición fetal a las glicoproteínas polisialadas de reacción cruzada expresadas en una variedad de tejidos de huéspedes, tales como la molécula de adhesión de células neurales ("NCAM") (Finne y
10 colaboradores, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 482; Hayrinen y colaboradores, 1995, *J. Infect. Dis.* 171: 1481). Se han preparado anticuerpos monoclonales anti-NmB PS (mAbs) mediante la inmunización de ratones con bacterias muertas del Grupo B (Mandrell y colaboradores, 1982, *J. Immunol.* 129: 2172; Moreno y
15 colaboradores, 1983, *J. Gen. Microbiol.* 129 (Pt 8): 2451; Shin y colaboradores, 2001, *Infect. Immun.* 69: 3335), o mediante la inmunización de ratones NZB con un polisacárido o una bacteria simple (Frosch y colaboradores, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.*, 82: 1194; Hurpin y colaboradores, 1992, *Hybridoma* 11: 677).
20 También se han descrito anticuerpos monoclonales de IgM o *para*-proteínas que reaccionan frente a los NmB PS humanos (Raff y colaboradores, 1988, *J. Infect. Dis.* 157: 118; Rohr y colaboradores, 1980, *J. Biol. Chem.* 255: 2332; Azmi y colaboradores, 1994, *Infect. Immun.* 62: 1776; Mandrell y colaboradores, 1995, *J. Infect. Dis.* 172:
25 1279). Estos anticuerpos monoclonales o *para*-proteínas provocan

una actividad bactericida mediada por el complemento. Por consiguiente, el desarrollo de vacunas basadas en los polisacáridos como antígeno, pero con una mejor inmunogenicidad, han sido el enfoque particular en el campo.

- 5 En la década de 1980, Jennings y colaboradores investigaron la inmunogenicidad de varios derivados de NmB PS (Jennings y colaboradores, 1981, *supra*, Jennings 1985, J. Immunol. 134: 2651; Ashton y colaboradores, 1989, Microb. Pathog. 6: 455; Pon y colaboradores, 1997, J. Exp. Med. 185: 1929). Las vacunas
- 10 conjugadas que contienen polisacáridos en los cuales los grupos N-acetilo de NmB PS se reemplazaron con una variedad de grupos acilo más hidrofóbicos, particularmente propionilo (N-Pr) fueron inmunogénicos y produjeron anticuerpos bactericidas protectores. El polisacárido modificado resultante se conjugó con un portador de
- 15 proteína (Jennings y colaboradores, 1986, J. Immunol. 137: 1708, 1986; Jennings y colaboradores, 1987, J. Exp. Med. 165: 1207; Jennings y colaboradores, 1981, *supra*; Jennings y colaboradores, 1985, *supra*; Ashton y colaboradores, 1989, *supra*; Pon y colaboradores, 1997, *supra*; Patente de los Estados Unidos de
- 20 Norteamérica Número 4,727,136), y se encontró que era inmunogénico en animales experimentales, produciendo anticuerpos de IgG que activaron la bacteriólisis mediada por el complemento *in vitro*, y que confirieron una protección pasiva en los animales experimentales infectados con NmB. Esta vacuna fue inmunogénica
- 25 en primates sub-humanos, induciendo los anticuerpos de suero que

activan la bacteriolisis mediada por el complemento (Fusco y colaboradores, 1997, *J. Infect. Dis.* 175: 364-372). En humanos, se sabe que los anticuerpos bactericidas confieren protección contra la enfermedad meningocócica en desarrollo (Goldschneider y colaboradores, 1969, *J. Exp. Med.* 129: 1307).

Sin embargo, un subgrupo de anticuerpos inducidos por las vacunas actualmente disponibles, tienen actividad de auto-anticuerpo contra el huésped para el NmB PS no modificado (es decir, N-acetil-NmB PS) (Hayrinen y colaboradores, 1995, *J. Infect. Dis.* 171: 1481; Granoff y colaboradores, 1998, *J. Immunol.*; 160: 5028-5036). Debido a que el poli-ácido siálico es expresado abundantemente en el tejido fetal y del recién nacido, especialmente en las moléculas de adhesión de células neurales encontradas en el tejido cerebral, este método provoca serias preocupaciones sobre la seguridad. Notoriamente, un sub-grupo de anticuerpos bactericidas producidos por N-Pr y otros derivados de NmB PS, se enlazaron específicamente con bacterias y no con los tejidos del huésped, y no se fueron absorbidos por las matrices de afinidad a NmB PS (Jennings y colaboradores, 1989, *J. Immunol.* 142: 3585; Pon y colaboradores, 1997, *supra*). Granoff y colaboradores inmunizaron ratones con N-Pr NmB PS conjugados con toxoide tetánico, y prepararon un panel de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-N-Pr NmB PS (Granoff y colaboradores, 1998, *J. Immunol.* 160: 5028). Un número de los anticuerpos monoclonales produjeron una actividad bactericida mediada por el complemento *in vitro*, y confirieron protección pasiva

contra la bacteremia en un modelo de rata infantil. Los anticuerpos monoclonales protectores se subclasificaron en cuatro diferentes grupos de especificidad antigénica fina, basándose en la presencia o ausencia de reactividad cruzada con los NmB PS nativos, y en la capacidad de los oligosacáridos N-Pr-MB (grado promedio de polimerización [Dp] = 3.8) para inhibir el enlace del anti-N-Pr-NmB PS en un ELISA. Los anticuerpos monoclonales, representativos de cada uno de los cuatro grupos de especificidad antigénica fina, mostraron una auto-reactividad mínima o no detectable con el poli-ácido siálico del huésped, basándose en los estudios de citometría de flujo con la línea celular humana CHP-134 (Granoff y colaboradores, 1998, *supra*), que expresa el poli-ácido siálico de cadena larga, y en la inmunohistología con tejido humano fetal. Los anticuerpos monoclonales se enlazaron a la superficie de bacterias encapsuladas vivas del Grupo B, pero no a un mutante deficiente capsular. No se definieron los epítomos de las bacterias reconocidos por estos anticuerpos monoclonales anti-N-Pr NmB PS.

La presente invención supera las desventajas de los métodos de la técnica anterior para la vacunación, al proporcionar composiciones y métodos de vacunación que producen una respuesta inmune, particularmente una respuesta inmune protectora contra las cepas de *Neisseria meningitidis* del Grupo B, mientras que al mismo tiempo no producen auto-anticuerpos detectables o significativos contra los tejidos del huésped.

BIBLIOGRAFÍA

Publicación del PCT Número WO99/10372 (Anti-N-Pr NmB PS mAbs, que reclama el beneficio de prioridad de la solicitud norteamericana provisional con número de serie 60/058,001, presentada el 27 de agosto de 1997); Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,048,527 (Anti-NmB antibodies); y Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,350,449 (Anti-NmB antibodies).

Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,030,619 (Granoff y Moe (Mimetics)).

Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,727,136 (Jennings (N-Pr NmB PS vaccine)).

Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,638,513.

Fusco y colaboradores. "Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates," (1997) J. Infect. Dis. 175: 364-72.

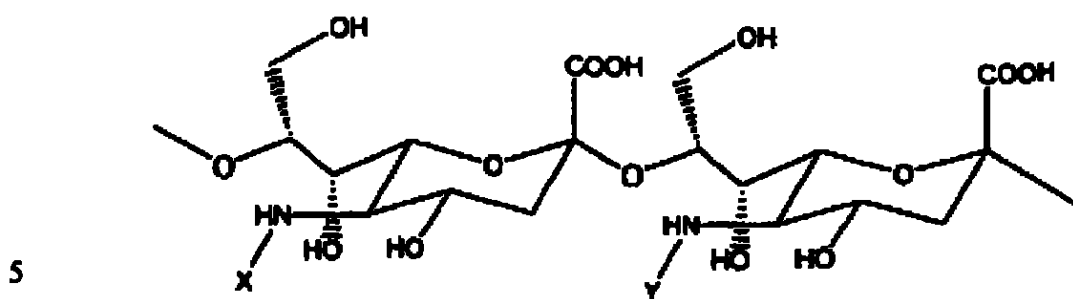
BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención en general proporciona composiciones que comprenden un derivado de polisacárido, y métodos para su preparación y uso para la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por bacterias *Neisseria meningitidis*, particularmente cepas (NmB) del Grupo B, y por K1 de *E.coli*. La invención proporciona un

derivado de polisacárido des-N-acetilado en el cual uno o más
residuos del polisacárido han sido modificados por la des-N-
acetilación. La invención también incluye derivados en los cuales
uno o más de los grupos N-acetilo del polisacárido que contienen los
5 polisacáridos des-N-acetilados se reemplazan con otros grupos N-
acilo, usualmente un grupo acilo inferior con 2 a 3 átomos de
carbono. Además la invención incluye los derivados de polisacáridos
des-N-acetilados que contienen hidrocarburos de cadena larga, así
como conjugados en los cuales el derivado de polisacárido des-N-
10 acetilado se enlaza a un portador, por ejemplo una proteína
portadora.

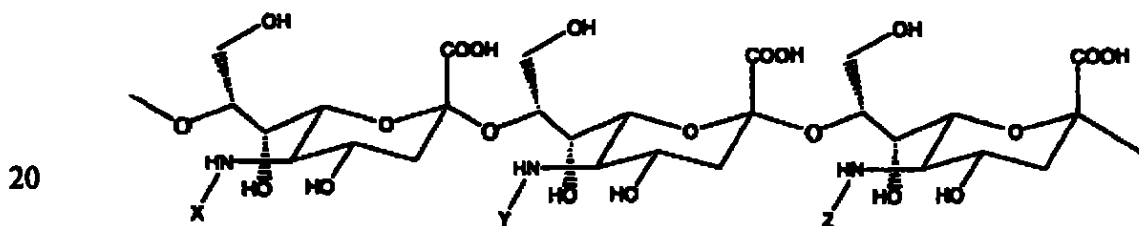
De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención
proporciona una composición que comprende un adyuvante y un
15 derivado de polisacárido (PS), comprendiendo el derivado de
polisacárido cuando menos un dímero de primero y segundo residuos
de un ácido siálico o de un derivado de ácido siálico, en donde el
primer residuo está N-acetilado y el segundo residuo comprende un
grupo amina libre, el primer residuo comprende un grupo amina libre
20 y el segundo residuo está N-acetilado, o los primero y segundo
residuos comprenden grupos amina libres.

En otra modalidad la invención proporciona una composición
que comprende un derivado de polisacárido que comprende una
25 estructura representada por la fórmula:



en donde X e Y son independientemente H o un grupo acetilo,
en donde el derivado de polisacárido se conjuga con una proteína
portadora o además comprende un residuo de ácido siálico que tiene
10 una alquil-amina secundaria en un extremo no reductor del derivado
de polisacárido. Los derivados de polisacárido en esta modalidad
generalmente tienen una o más estructuras colocadas dentro del
polímero.

En otra modalidad, la invención proporciona una composición
15 que comprende un derivado de polisacárido que comprende una
estructura representada por la fórmula:



en donde X, Y, y Z son independientemente H o un grupo acilo
saturado, con la condición de que cuando menos uno de X, Y, y Z es
H, cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acilo saturado, en
25 donde el derivado de polisacárido está opcionalmente conjugado con

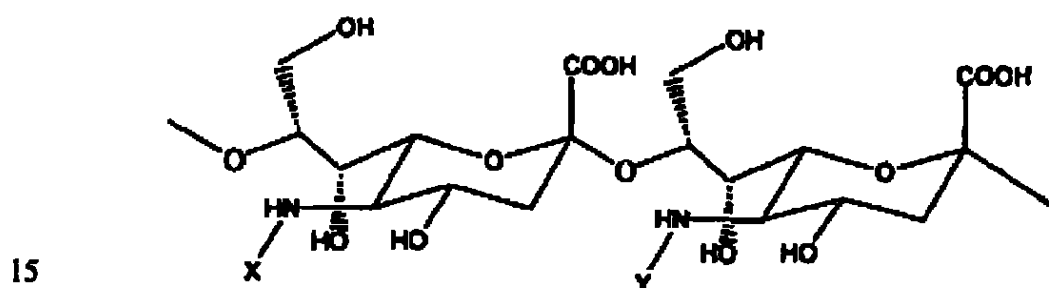
una proteína portadora, o además comprende un residuo de ácido siálico que tiene una alquil-amina secundaria en un extremo no reductor del derivado de polisacárido. Los derivados de polisacárido en esta modalidad generalmente tienen una o más de esas
5 estructuras colocadas dentro del polímero.

En las modalidades relacionadas, la estructura de la composición inmediatamente anterior es tal que, cuando dos de X, Y, y Z son grupos acilo, los grupos acilo son grupos acilo diferentes. En otras modalidades relacionadas la estructura de la composición es
10 tal que, cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acetilo, y cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo propionilo. En todavía otras modalidades relacionadas, la estructura de la composición es tal que, cuando X es H, Y y Z son grupos acilo diferentes; cuando X es un grupo acilo, Y y Z son fracciones diferentes, y son ya sea H o
15 un grupo acilo; y cuando X es un grupo acilo, Y y Z son fracciones diferentes, y son ya sea H o un grupo acilo. En todavía otras modalidades relacionadas, la estructura de la composición es tal que, cuando X es H, Y y Z son grupos acilo diferentes seleccionados a partir de acetilo y propionilo; cuando X es un grupo acetilo, Y y Z
20 son fracciones diferentes, y son ya sea H o un grupo propionilo; y cuando X es un grupo propionilo, Y y Z son fracciones diferentes, y son ya sea H o un grupo acetilo.

En todavía otras modalidades relacionadas, el derivado de polisacárido comprende un residuo de ácido siálico amidado que
25 tiene una alquil-amina secundaria, que se produce en un término no

reductor del derivado de polisacárido. En todavía otras modalidades relacionadas, el derivado de polisacárido se conjuga a una proteína portadora. En otras modalidades relacionadas el derivado de polisacárido comprende un derivado de un residuo de ácido siálico que tiene una fracción de lactona o una amina secundaria cíclica. En otras modalidades, el derivado de polisacárido es un compuesto heteropolimérico.

En otra modalidad, la invención proporciona una composición que comprende un derivado de polisacárido que comprende una estructura representada por la fórmula:

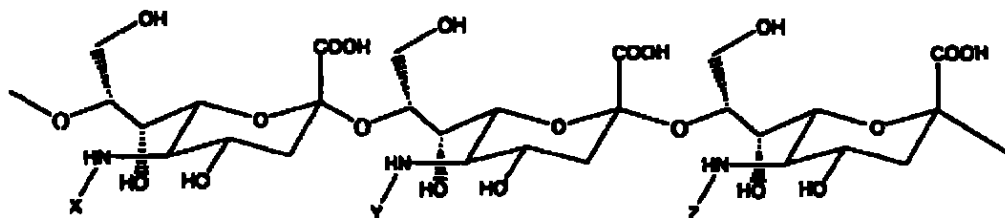


en donde X e Y son independientemente un grupo de protección de amina, o un grupo acilo saturado o insaturado, y en donde el derivado de polisacárido además comprende opcionalmente una proteína portadora conjugada con un residuo de ácido siálico del derivado de polisacárido, u opcionalmente además comprende un residuo de ácido siálico amidado que tiene una alquil-amina secundaria en un extremo no reductor del derivado de polisacárido. Los derivados de polisacárido generalmente tienen una o más de estas estructuras colocadas dentro del polímero. En las modalidades

relacionadas, el grupo acilo es un grupo acilo saturado y acetilo o propionilo.

En las modalidades relacionadas, el derivado de polisacárido comprende una estructura representada por la fórmula:

5



10

en donde X, Y, y Z son independientemente un grupo de protección de amina, con la condición de que cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo de protección de amina, y cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acilo saturado o insaturado. Los derivados de polisacárido en esta modalidad generalmente tienen una o más de esas estructuras colocadas dentro del polímero. En las modalidades relacionadas, el grupo acilo es un grupo acilo saturado y acetilo o propionilo.

15

En otras modalidades la invención proporciona métodos para inmunizar a un sujeto mediante la administración de una cantidad de un derivado de polisacárido de la invención, en una cantidad efectiva para producir una respuesta inmune, en donde esa administración es efectiva para producir una respuesta inmune en un sujeto contra el grupo B de *Neisseria meningitidis*. En otras modalidades, la invención proporciona métodos para inmunizar a un sujeto mediante la administración de una cantidad de un derivado de polisacárido de

20

25

la invención, en una cantidad efectiva para producir una respuesta inmune, en donde esa administración es efectiva para producir una respuesta inmune en un sujeto contra K1 de *E.coli*.

En otras modalidades, la invención proporciona métodos para proporcionar protección pasiva contra una infección bacteriana, mediante la administración a un sujeto, de los anticuerpos bactericidas producidos por medio de la inmunización de un huésped con un derivado de polisacárido de la invención, en donde esta administración proporciona la protección del sujeto contra el Grupo B de *Neisseria meningitidis* o contra K1 de *Escherichia coli*.

La invención también proporciona métodos para producir un derivado de polisacárido, los cuales involucran hacer reaccionar una molécula de polisacárido cuando menos parcialmente des-N-acetilada, con una mezcla que comprende un reactivo de protección de amina y un reactivo acilante, en la presencia de un solvente orgánico, en donde la reacción produce un derivado de polisacárido protegido que tiene un grupo de protección de amina y un grupo N-acilado. En las modalidades relacionadas los métodos además incluyen el tratamiento del derivado de polisacárido protegido bajo condiciones que retiran el grupo de protección de amina para producir un derivado de polisacárido. En otras modalidades relacionadas, los métodos además incluyen conjugar el derivado de polisacárido protegido con una proteína portadora para producir un derivado de polisacárido protegido conjugado, y tratar el derivado de polisacárido protegido conjugado bajo condiciones para retirar el

grupo de protección de amina, de tal forma que se produce un derivado conjugado de polisacárido. En otras modalidades relacionadas, los métodos además incluyen hacer reaccionar el derivado de polisacárido protegido con un reactivo de N-acil-amina para producir un derivado de polisacárido protegido amidado que tiene un residuo de ácido siálico amidado que tiene una alquil-amina secundaria, y tratar el derivado de polisacárido protegido amidado bajo condiciones para retirar el grupo de protección de amina, de tal forma que se produce un derivado de polisacárido que tiene un residuo de ácido siálico amidado que tiene una alquil-amina secundaria. La invención también contempla derivados de polisacáridos generados por medio de estos métodos.

La invención también proporciona métodos para producir un derivado de polisacárido (PS) mediante el cultivo de bacterias del Grupo B de *Neisseria meningitidis* en un medio de cultivo que comprende N-acil-manosamina y una manosamina protegida con amina, de tal forma que el cultivo proporciona la producción de un derivado de polisacárido protegido que tiene un grupo de protección de amina y un grupo N-acilado. En las modalidades relacionadas, la bacteria es deficiente en la producción de polisacárido de cápsulas en ausencia de manosamina complementaria. En las modalidades relacionadas, el método además incluye conjuguar el derivado de polisacárido protegido con una proteína portadora, para producir un derivado de polisacárido protegido conjugado, y tratar el derivado de polisacárido protegido conjugado bajo condiciones para retirar el

grupo de protección de amina, con el fin de producir un derivado de polisacárido conjugado. En las modalidades relacionadas, el método además incluye hacer reaccionar el derivado de polisacárido protegido con un reactivo de N-acil-amina, para proporcionar una
5 alquil-amina secundaria en un residuo de ácido siálico del derivado de polisacárido protegido, y tratar el derivado de polisacárido protegido bajo condiciones para retirar el grupo de protección de amina, en donde se produce un derivado de polisacárido que tiene un residuo de ácido siálico que contiene una alquil-amina
10 secundaria. La invención también contempla derivados de polisacárido generados por medio de esos métodos.

La invención además proporciona métodos para identificar un epítopo de poli-ácido siálico (PSA) enlazado por un anticuerpo o mediante el contacto de un derivado de poli-ácido siálico con un
15 anticuerpo, realizándose el contacto bajo condiciones adecuadas para la formación de complejos de antígeno-anticuerpo del anticuerpo y el derivado de polisacárido, y mediante el contacto del complejo de antígeno-anticuerpo con una sialidasa bajo condiciones adecuadas para retirar los residuos de derivados de poli-ácido siálico
20 accesibles para la sialidasa, de un complejo de antígeno-anticuerpo, de tal forma que los residuos de derivados de poli-ácido siálico restantes en el complejo de antígeno-anticuerpo después del tratamiento con sialidasa, definen un epítopo enlazado por medio del anticuerpo.

25 La invención es conveniente porque los derivados de NmB PS

de la invención pueden usarse para producir una respuesta inmune en un sujeto, la cual puede incluir anticuerpos bactericidas de suero que se enlazan específicamente a las bacterias NmB con poca o ninguna reactividad cruzada detectable con los residuos polisiálicos del tejido normal del huésped.

Otras ventajas de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica después de leer la presente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 proporciona la estructura de NmB PS después de la des-N-acetilación de acuerdo con la invención. R es H en la mayoría de los residuos para proporcionar una amina libre (o un grupo desacetilado). En una pequeña fracción de los residuos en el producto des-N-acetilado, R puede ser $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ (un grupo acetilo). "n" representa un número de residuos de ácido siálico en el polímero, que pueden tener el valor de "n" en otras formulas descritas en la presente.

La figura 2 es una tabla que describe los anticuerpos SEAM usados en los ejemplos para facilitar la identificación del o de los epítopos de un derivado de NmB PS específicamente enlazado por medio de los anticuerpos bactericidas anti-NmB PS, y no por medio de los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el poli-ácido siálico del huésped.

La figura 3 proporciona la estructura de una fracción de lactona formada entre el grupo carboxilo C1 y el grupo hidroxilo C9 del residuo anterior en el NmB PS, después del tratamiento con ácido

del NmB PS.

La figura 4 proporciona la estructura de un derivado de polisacárido que tiene un grupo aldehído en el residuo terminal del extremo no reductor.

5 La figura 5 es una tabla que proporciona un resumen de los resultados de los ensayos de inhibición ELISA para determinar la actividad inhibidora de varios derivados de NmB PS después de enlazar los anticuerpos monoclonales SEAM a los N-Pr NmB PS.

10 La figura 6 es una tabla que proporciona un resumen de los resultados de los ensayos para determinar la actividad de varios derivados de NmB PS en la inhibición de la actividad bactericida mediada por el complemento, de los anticuerpos monoclonales anti-N-Pr NmB PS, medida contra la cepa 8047 del Grupo B de *N. meningitidis*.

15 La figura 7 es una gráfica que muestra los datos de la inhibición de la actividad bactericida mediada por el complemento, para el anticuerpo monoclonal SEAM 3, en la presencia de varios derivados de NmB PS.

20 La figura 8 muestra el espectro de masas de los derivados de polisacárido seleccionados y protegidos de la disociación de la neuraminidasa por medio del SEAM 3.

La figura 9 es una tabla que resume las masas observadas para cada muestra y las masas teóricas de los iones correspondientes que son consistentes con las masas observadas.

25 Las figuras 10-19 proporcionan estructuras de los derivados de

48
17

polisacárido des-N-acetilados identificados en la figura 9.

Las figuras 20-22 proporcionan estructuras de los derivados de NmB PS preparados e identificados en el Ejemplo 1.

Las figuras 23-37 proporcionan estructuras de los derivados de
5 polisacárido de acil-amina des-N-acetilados de la invención.

La figura 38 es una tabla que resume los resultados del enlace del anticuerpo monoclonal a los derivados de MBPS de dodecil-amina medidos por medio de ELISA de enlace directo. Los anticuerpos monoclonales SEAM-2, 3, 12, y 18 se describen en la
10 Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,048,527. El anticuerpo monoclonal SEAM 38 se describe en Granoff y colaboradores, 1998, J. Immunol. 160: 5028.

La figura 39 es una tabla que resume los resultados del enlace del anticuerpo monoclonal a los conjugados de BSA-derivado de
15 MBPS, medido por medio de ELISA de enlace directo. Los anticuerpos monoclonales SEAM-2, 3, 12, y 18 se describen en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,048,527. El anticuerpo monoclonal SEAM 38 se describe en Granoff y colaboradores, 1998, J. Immunol. 160: 5028.

20 Antes de que se describa la presente invención y las modalidades de ejemplo específicas de la invención, se debe entender que esta invención no está limitada a las modalidades particulares descritas, pues por supuesto, éstas pueden variar. Debe también entenderse que la terminología usada en la presente, tiene
25 el propósito de describir las modalidades particulares solamente, y

no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención será limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporcione un intervalo de valores, se entiende que cada valor participante, al décimo de la unidad del límite más bajo, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y que cualquier otro valor participante en el intervalo mencionado, está abarcado dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de los intervalos más pequeños se pueden incluir independientemente en los intervalos más pequeños que también se incluyen en la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido del intervalo mencionado. Cuando el intervalo indicado incluya uno o ambos límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyan a cualquiera de los dos límites incluidos.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por alguien con experiencia ordinaria en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención también se pueden emplear cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan como referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

48
49

Debe observarse que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una pluralidad esos antígenos, y la referencia a "el péptido" incluye la referencia a uno o más péptidos y sus equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, etc.

Las publicaciones descritas en la presente se proporcionan exclusivamente por su divulgación previa a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo que se indica en la presente debe considerarse como una admisión de que la presente invención no tiene derechos de anterioridad sobre esas publicaciones debido a una previa invención. Además las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que probablemente requieran ser confirmadas independientemente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de que NmB contiene residuos de des-N-acetilo en el polisacárido capsular (PS) y que las vacunas basadas en NmB-PS que contienen los residuos de des-N-acetilo (aproximadamente o más del 25 por ciento) puede producir anticuerpos que son protectores contra las enfermedades causadas por NmB, pero que no reaccionan de forma cruzada o sólo mínimamente con los antígenos de poli-ácido siálico (PSA) propios expresados por los tejidos humanos. Específicamente

los inventores han descubierto que el epítipo mínimo de esas vacunas es un disacárido PS en el cual uno o ambos residuos contienen residuos de des-N-acetilo.

El epítipo mínimo de esos anticuerpos anti-NmB PS
5 es una unidad disacárida de esos derivados de NmB PS, en donde la unidad de disacárido comprende uno o más residuos en los cuales se ha retirado el grupo N-acetilo en el grupo amino C-5; o en donde uno de los dos residuos son des-N-acetilados, el segundo residuo contiene un grupo N-acetilo (pero en algunas modalidades, no es un
10 grupo N-propionilo). La unidad disacárida que define el epítipo mínimo puede encontrarse en el extremo reductor, el extremo no reductor, o dentro del polisacárido. Los residuos des-N-acetilados en el contexto del poli-ácido siálico que contiene residuos N-acilados son inmunogénicos y producen anticuerpos que son reactivos con la
15 cápsula NmB pero son mínimamente reactivos o reactivos de forma no detectable con los antígenos del poli-ácido siálico humanos. Este planteamiento proporciona un método seguro y eficaz para la prevención de la enfermedad causada por NmB. Además, debido a que el polisacárido capsular de K1 de *E.coli* es química e
20 inmunológicamente idéntico a aquél de NmB, la invención también es aplicable a la producción de derivados de polisacárido para usarse en la prevención de enfermedades provocadas por K1 de *E.coli*.

El epítipo de polisacárido NmB des-N-acetilado se identificó
25 usando un panel de los mABs (anticuerpos monoclonales) de

polisacárido anti-N-Pr NmB de murino descritos por Granoff y colaboradores, 1998, J Immunol 160: 5028 (Anti-N-Pr NmB PS mAbs); y en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 6,048,527 (Anti-NmB antibodies); y US 6,350,449 (Anti-NmB antibodies). Estos anticuerpos monoclonales (denominados posteriormente en la presente como anticuerpos monoclonales "SEAM") se usaron para purificar los derivados de polisacárido NmB.

La invención presenta de esta manera epítopos de polisacárido N-acetilados, y formulaciones de aquéllos apropiados para la administración a un huésped con el fin de producir una respuesta de anticuerpo anti-polisacárido NmB. Además, debido a que el polisacárido capsular de K1 de *E. coli* tiene la misma estructura que el polisacárido capsular de *N. meningitidis*, la invención también proporciona los epítopos de polisacárido des-N-acetilados, y las formulaciones de aquéllos adecuados para la administración a un huésped, con el fin de producir una respuesta de anticuerpos anti-polisacárido K1 de *E. coli*.

La invención también incluye conjugados de compuestos que contienen epítopos de polisacáridos des-N-acetilados en composiciones antigénicas adecuadas para administrarse a un huésped.

La invención también incluye composiciones que comprenden un derivado de poli-ácido siálico des-N-acetilado de la invención, como una unidad monomérica o una unidad polimérica (por ejemplo dos o más residuos, cuyo poli-ácido siálico puede proporcionarse en

las composiciones como una estructura homopolimérica o heteropolimérica) de la composición. La composición puede comprender residuos adicionales unidos en el término no reductor, en el término reductor, o tanto al término no reductor como reductor de un poli-ácido siálico des-N-acetilado de la invención.

La invención también proporciona métodos para hacer el polisacárido des-N-acetilado, los cuales comprenden poner en contacto un polisacárido des-N-acetilado con un agente acilante, tal como anhídrido de acilo, bajo condiciones tales que los residuos N-acilados del derivado de polisacárido des-N-acetilado representen menos del 90 por ciento, menos del 85 por ciento, menos del 84 por ciento, menos del 80 por ciento, menos del 75 por ciento, menos del 70 por ciento, menos del 60 por ciento, o menos del 55 por ciento o menos del 50 por ciento de los residuos totales del compuesto (por ejemplo, cuando los residuos totales en el compuesto son generalmente cuando menos de aproximadamente 10 a 20 residuos) y los residuos des-N-acetilados (residuos con aminas libres) son cuando menos el 10 por ciento, cuando menos el 15 por ciento, cuando menos el 16 por ciento, cuando menos el 20 por ciento, cuando menos el 25 por ciento, cuando menos el 30 por ciento, cuando menos el 40 por ciento, cuando menos el 45 por ciento, o cuando menos el 50 por ciento de los residuos totales en el compuesto (por ejemplo, cuando los residuos totales en el compuesto son generalmente de cuando menos aproximadamente 10 a 20 residuos). En este aspecto, la invención proporciona la ventaja

de controlar el nivel de acilación del producto final, para proporcionar un derivado de polisacárido des-N-acetilado que tiene el nivel deseado de acilación.

La invención además proporciona métodos para producir el
5 polisacárido des-N-acetilado, los cuales consisten en poner en contacto el polisacárido des-N-acetilado con una mezcla de agente acilante y reactivo de protección de amina. En este aspecto, la invención proporciona la ventaja de proteger el grupo amino C-5 de reacciones secundarias indeseables que se presenten durante la
10 preparación de los derivados de conjugado de polisacárido, y se retiran fácilmente del producto final, para proporcionar un derivado de polisacárido des-N-acetilado que tiene un nivel deseado de acilación.

La invención además proporciona métodos para producir el
15 polisacárido des-N-acetilado por medio de biosíntesis en una cepa de NmB al suplementar los medios de cultivo con una mezcla de una manosamina protegida con amina (por ejemplo N-trihaloacetil-D-manosamina) y N-acetil-D-manosamina. En este aspecto, la invención proporciona la ventaja de producir eficientemente el
20 polisacárido con el grupo amino C-5 protegido de las reacciones secundarias indeseables que se presentan durante la preparación de derivados de conjugado de polisacárido, y se retira fácilmente del producto final, para proporcionar el derivado de polisacárido des-N-acetilado que tiene el nivel deseado de acilación.

25 La invención proporciona además métodos para producir una

respuesta de anticuerpo anti-polisacárido NmB en un huésped, mediante la administración de una o más dosis inmunogénicas del polisacárido o conjugado de NmB des-N-acetilado (también referido en la presente como "conjugado PS"). Las administraciones son
5 efectivas para producir una respuesta de anticuerpo anti-polisacárido capsular NmB, con una producción de auto-anticuerpo del huésped insignificante o indetectable.

La invención además proporciona métodos para identificar epítopos de poli-ácido siálico que producen una respuesta inmune,
10 por ejemplo que protege contra un patógeno bacteriano, tal como NmB o K1 de *E.coli*, pero no anticuerpos anti-PSA que son reactivos con los antígenos de PSA normales del huésped, los cuales comprenden los pasos de:

(1) poner en contacto los anticuerpos con un derivado
15 de polisacárido, por ejemplo los anticuerpos que se enlazan al NmB PS (anticuerpos anti-NmB PS), al PSA del huésped (anticuerpos anti-PSA del huésped o "auto-anticuerpos"), o ambos, en donde el contacto es suficiente y bajo condiciones adecuadas para la formación de complejos de antígeno-anticuerpo con el derivado de polisacárido; y
20

(2) identificar los epítopos enlazados a los anticuerpos según se desee, por ejemplo los epítopos que se enlacen a anticuerpos que se enlacen a NmB PS pero no al PSA del huésped, en donde la identificación de los epítopos incluye el
25 tratamiento de los complejos de antígeno-anticuerpo con una

enzima apropiada (por ejemplo sialidasa, por ejemplo una endo- o exo-sialidasa). El uso de neuraminidasa es de un Interés particular.

El método puede además comprender la purificación por
 5 afinidad de los complejos de antígeno-anticuerpo tratados con neuraminidasa, seguida por el análisis (por ejemplo análisis MALDI-TOF) para determinar el epítipo. En las modalidades relacionadas, el derivado de PSA se presenta como una biblioteca que contiene diferentes derivados de PSA.

10 DEFINICIONES

"PS" como se usa en la presente, se refiere a polisacárido, usualmente un polisacárido capsular, particularmente un polisacárido capsular que tenga uno o más residuos des-N-acetilados, incluyendo el polisacárido capsular de *N. meningitidis* o *Escherichia coli*, siendo
 15 de un Interés particular el Grupo B de *N. meningitidis* y K1 de *E. coli*. "NmB PS" como se usa en la presente, se refiere a un PS del grupo B de *N. meningitidis*. La referencia a NmB PS en toda la descripción pretende ser ejemplar de las estructuras de polisacáridos adecuadas para la producción de composiciones y uso en los métodos de la
 20 invención.

"Derivado de PS" como se usa en la presente, se refiere a un polisacárido (PS) modificado, generalmente modificado químicamente, en particular un polisacárido del Grupo B de *Neisseria meningitidis*, o de K1 de *Escherichia coli*, siendo de particular interés
 25 los derivados de polisacárido que tienen una amina libre (es decir,

una amina primaria) en lugar de uno o más grupos N-acetilo. En general, los derivados de polisacárido no incluyen gangliósidos o derivados de gangliósidos.

5 "El derivado de PS des-N-acetilado" como se usa en la presente, se refiere a un derivado de polisacárido que tiene uno o más residuos des-N-acetilados, por ejemplo una o más aminas libres en la posición C-5 de uno o más residuos del derivado de polisacárido. El término "derivado de PS des-N-acetilado" no se pretende que implique que los derivados de PS des-N-acetilados se
10 limiten a los derivados de polisacárido generados por un proceso que involucre retirar un grupo acetilo de una molécula de polisacárido, sino contrariamente, a menos que se indique específicamente otra cosa, se pretende que implique a los derivados de PS des-N-acetilados generados por medio de cualquier método adecuado (por
15 ejemplo por medio de un método biosintético en el cual las aminas libres se generan en un derivado de PS des-N-acetilado por medio del retiro de un grupo de protección de trihaloacilo incorporado en la molécula de polisacárido durante la biosíntesis del polisacárido). Además el "residuo des-N-acetilado" se usa en la presente en el
20 contexto de un derivado de polisacárido para referirse a un residuo de ácido siálico en la molécula que tiene, en lugar de un grupo acetilo nativo, una amina primaria.

"Amina libre" y "amina primaria" se usan de forma intercambiable para referirse a un grupo NH_2 , como por ejemplo
25 RNH_2 , en donde "R" es un residuo de ácido siálico de un derivado de

polisacárido de la invención.

"Conjugado PS" como se usa aquí se refiere a un conjugado de un portador molecular (tal como proteína portadora) y un polímero homolíneal de ácido alfa(2→8)N-acetil-neuramínico o cualquier otro
5 polisacárido que contenga esta unidad monomérica, o sus derivados, incluyendo los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención. De interés particular es un conjugado de una proteína portadora y un derivado de polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* (particularmente un polisacárido capsular del Grupo B),
10 particularmente un derivado de polisacárido des-N-acetilado de la invención. También de interés particular es un conjugado de una proteína portadora y un derivado de polisacárido capsular de K1 de *E. coli*, particularmente un derivado de polisacárido des-N-acetilado de la invención.

15 El término "conjugado de NmB" o "conjugado de polisacárido capsular" o "conjugado de polisacárido capsular NmB" se pretende que se refieran a un conjugado entre un polisacárido capsular de *N. meningitidis*, particularmente el polisacárido capsular de *N. meningitidis* del Grupo B, incluyendo derivados de polisacáridos de
20 la invención y un portador, tal como el toxoide tetánico, CRM197, proteína Porina B de *Neisseria meningitidis* recombinante, o proteínas contenidas en las vesículas de las membranas exteriores de *Neisseria meningitidis*.

"Portador" como se usa en el contexto de un portador
25 conjugado a un derivado de polisacárido des-N-acetilado de la

invención, generalmente se refiere una sustancia que cuando se enlaza a un antígeno, sirve como antígeno dependiente de T que puede activar y reclutar células-T y así aumentar la producción de anticuerpos dependiente de las células-T. El portador no necesita ser
5 fuertemente inmunogénico por sí mismo, aunque los portadores fuertemente inmunogénicos están dentro del alcance de esta invención. Los portadores en este contexto son generalmente polipéptidos, los cuales pueden ser una proteína o un fragmento de una proteína.

10 "Conjugado" se refiere en general a un enlace químico, ya sea covalente o no-covalente, usualmente covalente, que asocia proximalmente el polisacárido des-N-acetilado con el portador de tal forma que el polisacárido des-N-acetilado conjugado con el portador tiene una mayor inmunogenicidad en relación con el polisacárido
15 des-N-acetilado no conjugado.

El término "inmunidad protectora" significa que un esquema de vacunación o inmunización que se administra a un mamífero induce una respuesta inmune que previene, retarda el desarrollo, o reduce la severidad de una enfermedad que es causada por un patógeno
20 (por ejemplo *Neisseria meningitidis*), o disminuye o elimina por completo los síntomas de la enfermedad. En este caso de *N. meningitidis*, la inmunidad protectora puede predecirse basándose en la capacidad del anticuerpo sérico para activar la actividad bactericida mediada por el complemento (Goldschneider 1969, J.
25 Exp. Med. 129: 1307-26) o conferir protección pasiva contra la

bacteremia meningocócica en un modelo de estímulo de animal adecuado (por ejemplo el modelo de rata infantil (Welsch y colaboradores, 2003 J. Infect. Dis. 188: 1730)).

La frase "una enfermedad provocada por una cepa del Grupo B de *Neisseria meningitidis*" incluye cualquier síntoma clínico o combinación de síntomas clínicos que están presentes en una infección con un miembro del Grupo B de *Neisseria meningitidis*. Esos síntomas incluyen, pero no se limitan a: la colonización del tracto respiratorio superior (por ejemplo mucosa de la nasofaríngeo y las amígdalas), por medio de una cepa patógena del Grupo B de *Neisseria meningitidis*, penetración de las bacterias en la mucosa y en el lecho vascular submucoso, septicemia, choque séptico, inflamación, lesiones hemorrágicas en la piel, activación de fibrinólisis y de la coagulación sanguínea, disfunción orgánica tal como falla renal, pulmonar, y cardíaca, hemorragia adrenal e infarto muscular, fugas capilares, edema, isquemia de los miembros periféricos, síndrome de insuficiencia respiratoria, pericarditis y meningitis.

La frase "enlazado específicamente a un anticuerpo" o "específicamente inmuno-reactivo con", cuando se refiere a un antígeno tal como un polisacárido, fosfolípido, proteína, o péptido, se refiere a una reacción de enlace que se basa en, y/o comprueba, la presencia del antígeno en una muestra, que puede también incluir una población heterogénea de otras moléculas. Por consiguiente, bajo las condiciones de inmunoensayo especificadas, el o los

anticuerpos especificados se enlazan a uno o varios antígenos particulares en una muestra, y no se enlazan en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en la muestra. El enlace específico a un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir de
5 un anticuerpo o antisuero que es seleccionado por su especificidad para uno o varios antígenos particulares.

Por medio de "auto-reactivos" en el contexto del enlace de anticuerpos, se implica que el anticuerpo se enlaza a un antígeno del huésped (por ejemplo un poli-ácido siálico del huésped (PSA)). Los
10 anticuerpos auto-reactivos incluyen aquéllos que se enlazan a los antígenos del huésped, así como a los antígenos extraños (por ejemplo NmB PS o PS K1 de *E. coli*). Un "anticuerpo no auto-reactivo" es un anticuerpo que no se enlaza de manera significativa o detectable a un antígeno del huésped, preferentemente no se enlaza
15 de manera detectable a un antígeno del huésped. Los anticuerpos no auto-reactivos de interés son los anticuerpos que se enlazan específicamente a NmB PS o a PS K1 de *E. coli*, cuyos anticuerpos también pueden ser, y preferentemente son, bactericidas para NmB PS o PS K1 de *E. coli*.

20 La frase "en una cantidad suficiente para obtener una inmuno-respuesta" (por ejemplo, a los epítopos presentes en una preparación) significa que hay una diferencia perceptible entre un indicador de la inmuno-respuesta medido antes y después de la administración de una preparación particular del antígeno. Los
25 indicadores de la inmuno-respuesta incluyen, pero no se limitan a: la

concentración o la especificidad del anticuerpo, según lo detectado por un análisis tal como el inmuno-ensayo enlazado enzimas (ELISA), el análisis bactericida (por ejemplo, para detectar los anticuerpos bactericidas del suero), citometría de flujo, 5 inmunoprecipitación, inmunodifusión de Ouchter-Lowry; ensayos de detección de, por ejemplo, puntos, arreglos Western blot o antígenos; análisis de la citotoxicidad, y similares.

El término "anticuerpo" abarca las preparaciones de anticuerpos monoclonales y policlonales, así como preparaciones 10 que incluyen anticuerpos híbridos, anticuerpos alterados, fragmentos $F(ab')_2$, moléculas $F(ab)$, fragmentos F_v , fragmento de una sola cadena variable exhibido sobre fagos (scF_v), anticuerpos de un único dominio, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y sus fragmentos funcionales que exhiben las propiedades de enlace 15 inmunológico de la molécula madre del anticuerpo.

Según se usa en la presente, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición del anticuerpo que tiene una población homogénea del anticuerpo. El término no se limita a la manera en la cual se produce. El término abarca las moléculas 20 enteras de Inmunoglobulina, así como las moléculas Fab , los fragmentos $F(ab')_2$, los fragmentos F_v , la variable del fragmento de una sola cadena exhibida sobre el fago (scF_v), y otras moléculas que exhiban las propiedades de enlace inmunológico de la molécula monoclonal madre del anticuerpo monoclonal. Los métodos para 25 producir los anticuerpos monoclonales y policlonales se conocen en

la técnica y se describen más detalladamente adelante.

Un "antígeno" se define en la presente incluyendo cualquier sustancia que se pueda enlazarse específicamente a una molécula del anticuerpo. Un "inmunógeno" es un antígeno que es capaz de
5 iniciar la activación de linfocitos, dando por resultado una inmunorrespuesta específica al antígeno.

Con "epítopo" se quiere indicar un sitio en un antígeno al cual responden las células-B y/o las células-T específicas. El término también se utiliza alternativamente con "determinante antigénico" o
10 el "sitio determinante antigénico". Los sitios del epítopo de las células-B en las proteínas, los polisacáridos, u otros biopolímeros, se pueden componer de fracciones de diversas partes de la macromolécula que han sido reunidas por medio de plegado. Los epítopos de esta clase se refieren como epítopos conformacionales o
15 discontinuos, puesto que el sitio se compone de los segmentos del polímero que son discontinuos en la secuencia lineal pero continuos en la conformación plegada. Los epítopos que se componen de segmentos individuales de los biopolímeros o de otras moléculas se llaman epítopos continuos o lineales. Los epítopos de células-T se
20 restringen generalmente a los péptidos lineales. Los anticuerpos que reconocen al mismo epítopo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear el enlace de otro anticuerpo a un antígeno objetivo.

"Serogrupo" o "Grupo" como se usa en la presente, se refiere a
25 la clasificación de *Neisseria meningitidis* en virtud de las variaciones

inmunológicamente detectables en el polisacárido capsular. Aproximadamente se conocen 12 serogrupos: A, B, C, X, Y, Z, 29-E, W-135, H, I, K, y L. Cualquier serogrupo puede incluir múltiples serotipos y múltiples serosubtipos.

5 "Serotipo" como se usa en la presente, se refiere a la clasificación de cepas de *Neisseria meningitidis* con base en las diferencias antigénicas definidas por el anticuerpo monoclonal en la proteína de la membrana exterior Porina B. Un único serotipo puede encontrarse en múltiples serogrupos y múltiples serosubtipos.

10 "Serosubtipo" como se usa en la presente, se refiere a la clasificación de cepas de *Neisseria meningitidis* con base en las variaciones antigénicas definidas por el anticuerpo sobre una proteína de la membrana exterior llamada Porina A, o después de la tipificación VR de las secuencias de aminoácidos deducidas de la
15 secuenciación del ADN (Sacchi y colaboradores., 2000, *J. Infect. Dis.* 182: 1169; ver también el sitio de internet Multi Locus Sequence Typing). La mayor variabilidad entre las proteínas PorA ocurre en dos (lazos I y IV) de ocho lazos supuestos expuestos superficialmente. Los lazos variables I y IV han sido designados
20 como VR1 y VR2, respectivamente. Un serosubtipo único puede encontrarse en múltiples serogrupos y múltiples serotipos.

"Aislado" significa que un compuesto está separado de todos o de algunos de los componentes que lo acompañan en la naturaleza.

"Aislado" puede también referirse al estado de un compuesto
25 separado de todos o de algunos de los componentes que lo

acompañan durante la fabricación (por ejemplo, la síntesis química).

"Purificado" significa que un compuesto de interés se ha separado de los componentes que lo acompañan en la naturaleza.

"Purificado" puede también utilizarse para referirse a un compuesto
5 de interés separado de los componentes que pueden acompañarlo durante la fabricación (por ejemplo en la síntesis química).

Típicamente, un compuesto es substancialmente puro cuando está por lo menos el 50 por ciento al 60 por ciento en peso, libre de las moléculas orgánicas con las cuales está asociado naturalmente, o

10 con las cuáles está asociado durante la fabricación. Generalmente, la preparación consiste por lo menos en el 75 por ciento, preferiblemente por lo menos el 90 por ciento, y más preferiblemente por lo menos el 99 por ciento en peso, del compuesto de interés. Un compuesto substancialmente puro se puede obtener, por ejemplo,
15 por la extracción de una fuente natural (por ejemplo, bacterias), sintetizando químicamente un compuesto, o mediante una combinación de la modificación química y la purificación. Un compuesto substancialmente puro se puede también obtener, por ejemplo, enriqueciendo una muestra que tenga un compuesto que se
20 enlace a un anticuerpo del interés. La pureza se puede medir mediante cualquier método apropiado, por ejemplo cromatografía, espectroscopía de masas, análisis de HPLC, etc.

"Enriquecido" significa que una sustancia (por ejemplo, anticuerpo o antígeno) en una composición, es manipulada por un
25 experto o un médico, de modo que esté presente en por lo menos

una concentración tres veces mayor en relación al peso total, preferiblemente por lo menos una concentración de diez veces mayor, preferiblemente por lo menos una concentración de cien veces mayor, y muy preferiblemente por lo menos una concentración
5 1000 veces mayor que la concentración de ese antígeno en la cepa de la cual se obtuvo la composición del antígeno. Así, por ejemplo, si la concentración de un antígeno particular es de 1 microgramo por gramo de la preparación bacteriana total (o de la proteína bacteriana total), una preparación enriquecida contendría por lo menos 3
10 microgramos por gramo de la preparación bacteriana total (o de la proteína bacteriana total).

El término "inmunológicamente limpio con respecto a un derivado de polisacárido " denota un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un paciente humano) que no se haya expuesto al
15 derivado de polisacárido de la invención, ya sea solo o en el contexto de una molécula más grande, en suficientes cantidades para causar una respuesta inmune (por ejemplo, para el estímulo). Si han expuesto al individuo a una vacuna conjugada del polisacárido (en una o más dosis), el individuo tiene una propensión para la
20 producción de anticuerpos protectores y anticuerpos auto-reactivos (por ejemplo, una vacuna conjugada del polisacárido), y tiene una propensión a desarrollar una mezcla de anticuerpos protectores y auto-reactivos.

Un sujeto "estimulado" se refiere a un sujeto que ha sido
25 expuesto (por ejemplo, por medio de la administración) a un antígeno

(por ejemplo un polisacárido des-N-acetilado de la invención) en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune que, después de la subsecuente exposición al mismo o a un segundo antígeno (por ejemplo un conjugado de polisacárido), proporciona una respuesta
5 inmune de protección, cuya respuesta no tiene auto-anticuerpos importantes (por ejemplo clínicamente relevantes) o detectables.

Con "respuesta de anticuerpo clínicamente irrelevante" se quiere decir que la producción de los auto-anticuerpos se reduce en cuando menos 25 por ciento, cuando menos 40 por ciento, cuando
10 menos 50 por ciento, cuando menos 60 por ciento, cuando menos 75 por ciento, cuando menos 80 por ciento o más, usando los métodos de la invención, en comparación con la producción de auto-anticuerpos después de la inmunización del sujeto natural con una vacuna de polisacárido convencional (por ejemplo una vacuna de
15 conjugado de polisacárido, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4,727,138 (N-Pr-NmB conjugate vaccine)).

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente, se refiere a cualquier sustancia adecuada que proporcione
20 un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración de uno o varios compuesto(s) de interés a un sujeto. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" puede incluir sustancias referidas como diluyentes farmacéuticamente aceptables, aditivos farmacéuticamente aceptables, y portadores farmacéuticamente
25 aceptables.

DERIVADOS Y CONJUGADOS DEL POLISACÁRIDO

Como se observa antes, la invención se basa en el descubrimiento de que el epítipo mínimo reconocido por los anticuerpos monoclonales capsulares bactericidas anti-NmB Grupo B
5 no auto-reactivos, es un dímero de los residuos de ácido siálico o derivado de ácido siálico, en donde el dímero contiene cuando menos un residuo de ácido siálico des-N-acetilado adyacente a un residuo de ácido siálico N-acilado (por ejemplo, acetilado o propionilado), o un residuo de derivado de ácido siálico. Este epítipo
10 dimérico puede estar colocado dentro de un derivado de polisacárido des-N-acetilado en el extremo reductor, el extremo no reductor, o dentro del interior del compuesto (por ejemplo, a 1, 2, 3, 4, 5, 10 ó más residuos del extremo reductor o del extremo no reductor del compuesto). El epítipo dimérico puede estar presente como una o
15 más unidades diméricas dentro de un derivado de polisacárido des-N-acetilado (por ejemplo como unidades repetidas diméricas consecutivas o no consecutivas), o puede estar presente dentro de otras unidades presentes en el derivado de polisacárido des-N-acetilado, por ejemplo dentro de una unidad trimérica, que puede
20 estar presente en forma de unidades repetidas consecutivas o no consecutivas). Las moléculas de ejemplo dentro del alcance de la invención se describen en las figuras 10-19, 20-22, y 23-37.

Los derivados de polisacáridos des-N-acetilados de la invención, y útiles en los métodos de la invención, generalmente
25 incluyen cuando menos un epítipo dimérico, que puede estar

presente en un polisacárido completamente des-N-acetilado o un polisacárido cuando menos parcialmente des-N-acetilado, y pueden estar presentes en una molécula homopolimérica o heteropolimérica. Por ejemplo, un derivado de polisacárido de la invención puede
5 contener una o más estructuras tal como se describen más adelante (ver, por ejemplo, las fórmulas I-VII que se encuentran más adelante). Los derivados de polisacárido pueden contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más residuos de ácido siálico o derivados de los
10 mismos, y pueden tener un grado de polimerización (Dp) de aproximadamente 2 a aproximadamente 60, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, de aproximadamente 30 a aproximadamente 50, de aproximadamente 10 a 20, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18, siendo un Dp de aproximadamente 2 a
15 aproximadamente 10 de un interés particular. Los derivados del polisacáridos de tamaño más pequeño, pueden comprender otras modificaciones (por ejemplo, conjugación a un portador, lipidación, y similares) para proporcionar las moléculas del tamaño y/o de la inmunogenicidad convenientes. Los derivados del polisacárido de la
20 invención pueden comprender además 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 ó más residuos des-N-acetilados adyacentes, en donde, en algunas modalidades, particularmente cuando el derivado de polisacárido está compuesto sólo de residuos N-acetilados y des-N-acetilados ya no se modifica adicionalmente (por ejemplo, por medio de
25 conjugación a un portador o mediante la modificación de un residuo

de ácido siálico en el extremo reductor para que contenga una alquil-
amina secundaria), los residuos des-N-acetilados del derivado de
polisacárido pueden ser 30 por ciento o menos de los residuos
totales de la molécula, y los residuos N-acetilados pueden ser
5 aproximadamente 70 por ciento o más de los residuos totales de la
molécula.

Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención,
cuando se administran a un sujeto, promueven la producción de
anticuerpos que se enlazan a una bacteria (por ejemplo, una
10 respuesta anti-NmB o anti-K1 de *E. coli*). Esos anticuerpos, que
pueden ser bactericidas en el caso de los anticuerpos anti-NmB o
anti-K1 de *E. coli*, no son auto-reactivos de manera significativa o
detectable con el poli-ácido siálico del sujeto (por ejemplo, el poli-
ácido siálico humano).

15 En general, los derivados de polisacáridos des-N-acetilados de
la invención son cuando menos parcialmente des-N-acetilados, de tal
forma que los derivados de polisacáridos son compuestos
zwitteriónicos compuestos de residuos polisacáridos o sus derivados,
y contienen uno o más dímeros y/o uno o mas trímeros, que
20 presentan una epítipo como se describe anteriormente. Los
derivados de polisacáridos des-N-acetilados en general contienen
cuando menos un epítipo dimérico, en donde el epítipo dimérico se
caracteriza porque tiene (1) primero y segundo residuos des-N-
acetilados; (2) un primer residuo N-acilado, y un segundo residuo
25 des-N-acilado adyacente (esto es, un residuo que tiene un grupo

amina libre), en donde el residuo N-acilado no es un grupo N-propionilo (N-Pr); o (3) un primer residuo des-N-acilado (esto es, un residuo que tiene un grupo amina libre), y un segundo residuo N-acilado adyacente. En ciertas modalidades el residuo N-acilado
5 comprende un grupo acilo insaturado; en otras modalidades, el residuo N-acilado no contiene un grupo N-propionilo (N-Pr) (esto es, el residuo de ácido siálico en el dímero no está N-propionilado).

Como se usa en la presente, un "grupo acilo" incluye un grupo acilo saturado o insaturado, usualmente un grupo acilo de 2 a 18
10 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 16 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 12 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 10 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 8 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 6
15 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 4 átomos de carbono saturado o insaturado, o un grupo acilo de 2 a 4 átomos de carbono saturado. Un grupo acilo saturado, como se utiliza en la presente, se refiere a un carbonilo unido a un grupo alquilo saturado; un grupo acilo insaturado como se usa en la
20 presente, pretende referirse a un carbonilo unido a un grupo alquilo insaturado. En algunas modalidades, los grupos acilo insaturados son de interés en particular. Los residuos del dímero pueden ser un ácido siálico o un derivado de ácido siálico, tal como una lactona o un ácido siálico cíclico.

25 De acuerdo con lo anterior, los derivados de polisacárido de la

invención contienen uno o más residuos des-N-acetilados de una fracción de ácido siálico o sus derivados (por ejemplo, una lactona, un ácido siálico cíclico, y similares), cuyos residuos des-N-acetilados pueden estar colocados dentro del derivado de polisacárido en el extremo reductor, el extremo no reductor, o dentro del interior del derivado de polisacárido (esto es, entre los extremos reductores y no reductores), siendo los derivados de polisacárido que tienen residuos N-acetilados en el extremo reductor de un interés particular.

Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención pueden ser provistos como una estructura que presenta un solo epítopo dimérico, o una unidad polimérica que presenta dos o más epítopos diméricos. Los derivados de polisacárido des-N-acetilados pueden ser estructuras homopoliméricas o heteropoliméricas, las cuales pueden estar compuestas de una o más de las estructuras que se encuentran más adelante, así como, en algunas modalidades, los residuos de ácido siálico des-N-acetilados o N-acetilados adicionales. Cuando una fórmula se provea más adelante con una referencia a "n" unidades (por ejemplo, unidades de una estructura dimérica o trimérica), el derivado de polisacárido puede contener un múltiplo de esas "n" unidades. Por ejemplo, un derivado de polisacárido de la invención puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó más unidades consecutivas o no consecutivas de una estructura dimérica o trimérica, en donde "n" se refiere al número de estructuras diméricas o triméricas consecutivas dentro cada unidad. Esas unidades diméricas y triméricas pueden separarse por medio de

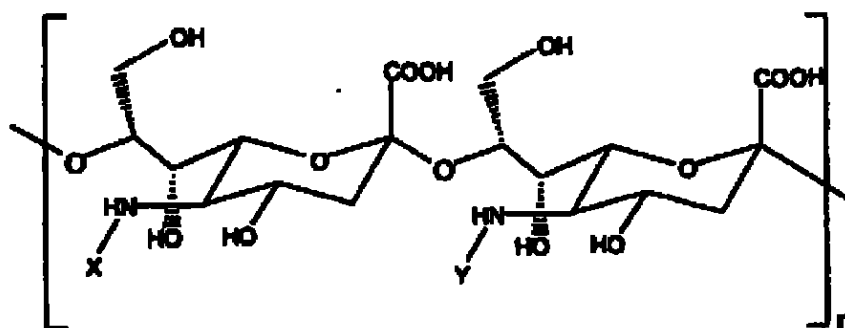
residuos siálicos.

Los derivados de polisacáridos de la invención pueden además
contener fracciones adicionales unidas al residuo de ácido siálico o
su derivado en el término no reductor, en el término reductor, o tanto
5 en el término no reductor como reductor del polímero de
polisacárido.

En una modalidad los derivados de polisacárido des-N-
acetilados de la invención incluyen aquéllos que comprenden una
estructura representada por la fórmula:

10

15



FORMULA I

en donde:

X e Y son independientemente H, un grupo de protección de
20 amina (por ejemplo, un grupo trihaloacilo), o un grupo acilo saturado
o insaturado (generalmente un grupo acilo saturado), en donde, en
algunas modalidades, X e Y son independientemente: 1) H o un
grupo de protección de amina; o 2) un grupo acilo saturado o
insaturado, y

25 n es cuando menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,

15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más, generalmente 5 ó más, más generalmente 10 ó más, y puede tener un grado de polimerización (Dp) de aproximadamente 2 a aproximadamente 60, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, de aproximadamente 30 a aproximadamente 50, de aproximadamente 10 a 20, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18, siendo un Dp de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 de un interés particular,

y además en donde:

10 cuando X es un grupo acilo saturado o insaturado (en algunas modalidades, diferente de un grupo propionilo, y en otras modalidades, diferente de un grupo acilo insaturado); Y es H o un grupo de protección de amina; y

cuando Y es un grupo acilo saturado o insaturado (en algunas modalidades, diferente de un grupo propionilo, y en otras modalidades, diferente de un grupo acilo insaturado); X es H o un grupo de protección de amina. En otra modalidad de interés particular, X e Y son independientemente H o un grupo acilo saturado o insaturado, generalmente un grupo acilo insaturado. En otras modalidades, X e Y son independientemente un grupo de protección de amina (por ejemplo, un grupo trihaloacilo), o un grupo acilo saturado o insaturado, usualmente un grupo acilo saturado. En algunas modalidades, particularmente cuando X o Y es H o un grupo acilo insaturado, el derivado de polisacárido está N-alcilado en menos del 90 por ciento, usualmente menos del 85 por ciento, o

menos del 80 por ciento, particularmente cuando el derivado de polisacárido contiene cuando menos 10 ó 20 residuos.

En una modalidad de interés, X en la fórmula I es un grupo acilo saturado, e Y es H o un grupo de protección de amina. En una
5 modalidad de interés particular, X en la fórmula I es un grupo acetilo, e Y es H o un grupo de protección de amina (por ejemplo, un grupo trihaloacilo (por ejemplo, un grupo trihaloacetilo)). En otra modalidad de interés, X en la fórmula I es un grupo acilo saturado, e Y es H; o X es un grupo acetilo, e Y es H.

10 Cuando X o Y son grupos de protección de amina (por ejemplo, un grupo trihaloacilo), estos derivados de polisacárido se refieren aquí como "derivados de polisacárido protegidos", en donde el grupo de protección de amina actúa para impedir que el grupo amina sufra una reacción durante la posterior modificación del derivado de
15 polisacárido protegido, por ejemplo conjugación de la molécula a un portador (por ejemplo, una proteína portadora), adición de una fracción lipida (por ejemplo adición de una acil-amina en un extremo no reductor del derivado de polisacárido protegido), y similares. El grupo de protección de amina puede subsecuentemente modificarse
20 para proporcionar una amina libre en el residuo. Los derivados de polisacárido protegidos en general son ejemplificados por las estructuras descritas en la presente, cuando un grupo de protección de amina está presente en una posición variable en lugar de un hidrógeno. Esto es, cuando podría desearse un hidrógeno en un
25 derivado de polisacárido para proporcionar una amina libre, los

derivados de polisacárido protegidos contienen un grupo de protección de amina en ese residuo en vez del hidrógeno de la amina libre.

Como se usa en la presente, "grupo de protección de amina" se
5 refiere a un radical o grupo de átomos que está unido a un átomo de nitrógeno de amina de una molécula para impedir que el átomo de nitrógeno participe en reacciones que ocurran en otras fracciones de la molécula. El término "protegido con amina" denota la
10 característica estructural de una molécula que contiene un átomo de nitrógeno de amina, por medio del cual se evita que el átomo de nitrógeno participe en reacciones que ocurran en otras fracciones de la molécula.

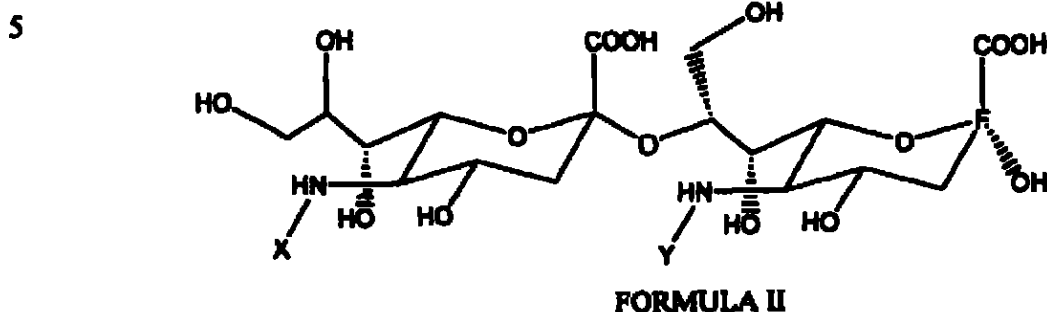
Los grupos de protección de amina ejemplares para usarse en la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a,
15 carbamatos, amidas, N-alquil- y N-aril-aminas, derivados de imina, derivados de enamina, N-sulfonilos, y similares. Otros grupos de protección de amina ejemplares incluyen, pero no se limitan necesariamente a: tipos de acilo tales como formilo, trifluoroacetilo, ftalilo, y p-toluensulfonilo; tipos de carbamato aromático, tales como
20 bencilloxycarbonilo (Cbz) y benciloxi-carbonilos sustituidos, 1-(p-bifenil)-1-metiletoxi-carbonilo, y 9-fluorenil-metiloxi-carbonilo (Fmoc); tipos de carbamatos alifáticos tales como terbutiloxi-carbonilo (tBoc), etoxi-carbonilo, di-isopropil-metoxi-carbonilo, y aliloxi-carbonilo; tipos de carbamatos de alquilo cíclicos, tales como ciclopentiloxi-
25 carbonilo y adamantiloxi-carbonilo; tipos de alquilo tales como

- trifenilmetilo y bencilo; trialkililano tales como trimetilsilano; y tipos que contienen tiol tales como feniltiocarbonilo y diltiosuccinilo. Los grupos de protección de amina y los grupos amina protegidos son descritos, por ejemplo, por C. B. Reese y E. Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry," J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press, Nueva York, N. Y., 1973, Capítulos 3 y 4, respectivamente, y T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," segunda Edición, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y., 1991, Capítulos 2 y 3.
- 10 Otros grupos de protección de amina ejemplares de interés particular incluyen grupos trihaloacilo, tales como trihaloacetilo y trihalopropionilo (por ejemplo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, tricloropropionilo, trifluoropropionilo), y similares, siendo de interés los grupos trihaloacetilo.
- 15 En una modalidad de interés particular, el derivado de polisacárido que presenta una estructura de la fórmula I, se conjuga a un portador, por ejemplo por medio de una unión covalente a través de una cetona C2 un aldehído C6, un aldehído C7, o un aldehído C8, como se describe más adelante (por ejemplo, una
- 20 proteína portadora C2-NH o una proteína portadora C6-NH), en donde el portador puede estar presente ya sea en el extremo reductor o no reductor o ambos (por ejemplo por medio de un enlace a un residuo en el extremo reductor del derivado, a un residuo en el extremo no reductor del derivado, o ambos). En otra modalidad de
- 25 interés particular, el derivado de polisacárido comprende cuando

menos un dímero de la fórmula I, y presenta, en el extremo no reductor, un residuo de ácido silílico N-acilado o des-N-acilado, sustituido con una acil-amina (por ejemplo una acil-amina saturada o insaturada, generalmente una acil-amina grasa saturada o insaturada, usualmente una acil-amina saturada (por ejemplo NHC_{2-18} , NHC_{2-12} , NHC_{2-10} , NHC_{2-8} , NHC_{4-12} , y similares) (ver, por ejemplo, la fracción en el extremo no reductor de las fórmulas IVa y IVb). Estas últimas modalidades que comprenden un portador y/o una acil-amina son de interés particular cuando el derivado de polisacárido comprende una estructura de la fórmula I, en donde X es H, e Y es un grupo acetilo, o en donde X es un grupo acetilo e Y es H. En otra modalidad específica en la cual el derivado de polisacárido presenta una estructura de la fórmula I, en la cual X es H e Y es un grupo acetilo, o cuando X es un grupo acetilo e Y es H, el derivado de polisacárido se proporciona en combinación con un adyuvante tal como se describe más adelante, en donde el derivado de polisacárido y el adyuvante se proveen preferentemente en un portador farmacéuticamente aceptable (diluyente seco o acuoso).

En una modalidad el dímero es un disacárido, en donde el disacárido comprende uno o más residuos en los cuales el grupo N-acetilo en el grupo amino C-5 ha sido retirado, o cuando uno de los dos residuos son des-N-acetilados, el segundo residuo contiene un grupo N-acetilo (pero en algunas modalidades no es un grupo N-propionilo). La unidad disacárida que define este epítipo mínimo puede encontrarse en el extremo reductor, en el extremo no reductor,

o dentro del polisacárido. Cuando el derivado de polisacárido des-N-acetilado se provee como un disacárido, la composición puede tener la estructura:



10

en donde X e Y son independientemente H, un grupo de protección de amina (por ejemplo, un grupo trihaloacilo), o un grupo acilo saturado o insaturado; preferentemente además en donde, cuando X es un grupo acilo (preferentemente diferente a un grupo propionilo), Y es H o un grupo de protección de amina; y cuando Y es un grupo acilo (preferentemente diferente a un grupo propionilo), X es H o un grupo de protección de amina. En una modalidad de interés particular, X es un grupo acetilo, e Y es H. Cuando X y/o Y son un grupo de protección de amina, el compuesto es referido en la presente como un derivado de polisacárido protegido, en donde los grupos de protección pueden explotarse como se describe anteriormente. Los grupos de protección de amina ejemplares son aquéllos descritos en lo anterior. Un derivado de polisacárido de la fórmula II puede ser modificado posteriormente para incluir un portador y/o una acil-amina, como se describe anteriormente para los

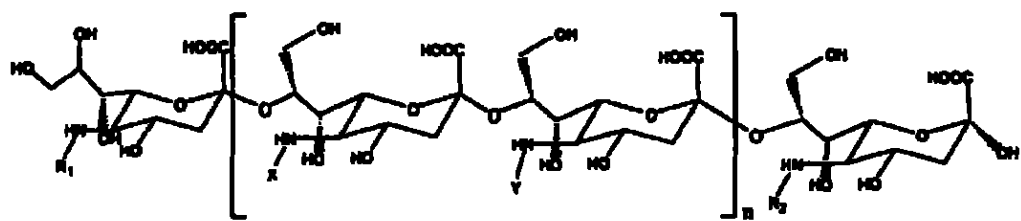
15

20

25

derivados de polisacárido de la fórmula I, en particular cuando X es H e Y es un grupo acetilo; o cuando X es un grupo acetilo e Y es H.

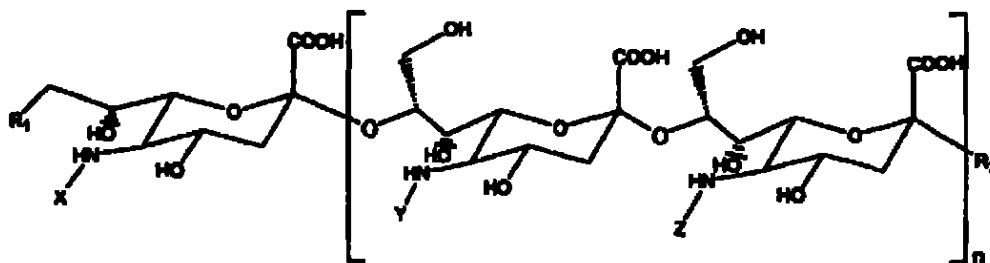
Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención también incluyen aquéllos que comprenden una estructura
5 representada por la fórmula:



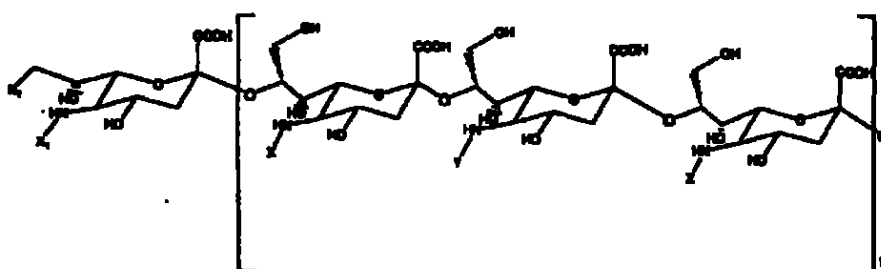
FORMULA III

en donde X, Y, y n son como se definen anteriormente, y R₁ y R₂ son independientemente H o un grupo de protección de amina (por ejemplo, un grupo trihaloacilo); o un grupo acilo (por ejemplo, un grupo acetilo) como se describe en lo anterior. Un derivado de polisacárido de la fórmula III puede modificarse posteriormente para incluir un portador y/o una acli-amina, siendo la modificación de los derivados de polisacárido protegidos de un interés particular, como se describe anteriormente para los derivados de polisacárido de las fórmulas I y II, particularmente cuando X es H e Y es un grupo acetilo, y en donde X es un grupo acetilo e Y es H.

En otra modalidad el derivado de polisacárido des-N-acetilado presenta una estructura representada por las fórmulas:



FORMULA IVa



FORMULA IVb

en donde:

X_1 , X , Y , y Z son H, un grupo de protección de amina (por ejemplo, un grupo trihaloacilo), o un grupo acilo saturado o insaturado, usualmente un grupo acilo insaturado, usualmente en donde X_1 , X , Y , y Z son: 1) H o un grupo de protección de amina; o 2) un grupo acilo saturado o insaturado (usualmente un grupo acilo saturado); con la condición de que cuando menos uno de X , Y , y Z es H o un grupo de protección de amina; y cuando menos uno de X , Y , y Z es un grupo acilo saturado o insaturado (generalmente saturado); siendo las modalidades de interés particular aquéllas en las que

cuando menos uno de X, Y, y Z es H o un grupo de protección de amina; cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acetilo, y cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo propionilo;

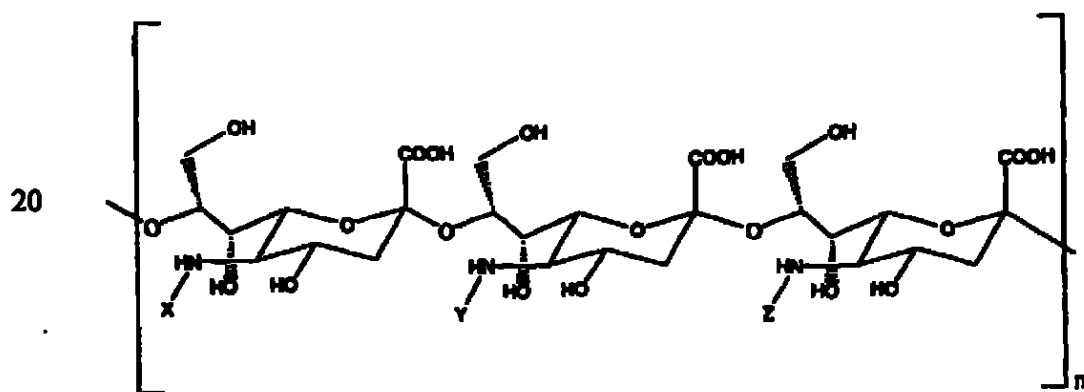
n es cuando menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 5 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más, generalmente 5 residuos o más, más generalmente aproximadamente 10 residuos o más (por ejemplo, con un grado de polimerización (Dp) de aproximadamente 2 a aproximadamente 60, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, de aproximadamente 30 a 10 aproximadamente 50, de aproximadamente 10 a 20, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18, siendo un Dp de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 de un interés particular);

R₁ es una acil-amina saturada o insaturada usualmente una acil-amina grasa saturada o insaturada, usualmente una acil-amina 15 saturada (por ejemplo, NHC₂₋₁₈, NHC₂₋₁₂, NHC₂₋₁₀, NHC₂₋₈, NHC₄₋₁₂, y similares); y

R₂ es un hidroxilo o uno o más residuos protegidos por amina, acilados (es decir, que tienen un grupo de protección de amina, por ejemplo, trihaloacilados) o residuos de ácido siálico des-N-acetilado, 20 como se describe en la presente. En una modalidad, R₂ es un polímero de residuos de ácido siálico des-N-acetilados y residuos de ácido siálicos acilados (usualmente un residuo de ácido siálico que tenga un grupo N-acilo saturado, por ejemplo residuos de ácido siálico acetilados, residuos de ácido siálico propionilados, y 25 similares).

En las modalidades de Interés particular, los derivados de polisacárido de las fórmulas IVa y IVb comprende cuando menos uno de cada uno de: una amina libre (o un grupo de protección de amina), un grupo acetilo, y un grupo propionilo. En esta modalidad, el derivado de polisacárido puede tener la estructura de la fórmula V, en donde, cuando X es H, Y y Z son diferentes grupos acilo y son un grupo acetilo o un grupo propionilo; cuando X es un grupo acetilo, Y y Z son diferentes fracciones y son ya sea H (o un grupo de protección de amina) o un grupo propionilo; y cuando X es un grupo propionilo, Y y Z son diferentes fracciones y son ya sea H (o un grupo de protección de amina) o un grupo acetilo. Las modalidades ejemplares se describen en las figuras 23-37.

En otra modalidad, los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención pueden describirse conteniendo cuando menos un trímero que tiene una estructura representada por la fórmula:



25 en donde:

X, Y, y Z son independientemente H, un grupo de protección de amina (por ejemplo, un grupo trihaloacilo), o un grupo acilo saturado o insaturado (usualmente un grupo acilo saturado); usualmente en donde X, Y, y Z son independientemente entre sí: 1) H o un grupo de protección de amina, o 2) un grupo acilo saturado o insaturado, usualmente un grupo acilo saturado; con la condición de que cuando menos uno de X, Y, y Z es H o un grupo de protección de amina; y cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acilo saturado o insaturado, usualmente un grupo acilo saturado; siendo las modalidades de particular interés aquéllas en las cuales cuando menos uno de X, Y, y Z es H o un grupo de protección de amina; cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acetilo; y cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo propionilo;

n es cuando menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más, generalmente 4 residuos o más, más generalmente aproximadamente 10 residuos o más (por ejemplo con un grado de polimerización (Dp) de aproximadamente 2 a aproximadamente 60, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, de aproximadamente 30 a 20 aproximadamente 50, de aproximadamente 10 a 20, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18, siendo un Dp de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 de un interés particular).

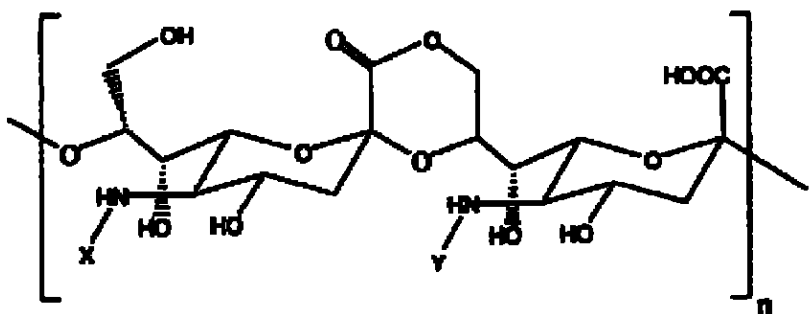
En las modalidades de interés particular, el derivado de polisacárido tiene una estructura de acilo mixta, en donde cada 25 trímero comprende cuando menos uno de cada uno de: una amina

libre, un grupo acetilo, y un grupo propionilo. En esta modalidad, el derivado de polisacárido tiene la estructura de la fórmula V, en donde X es H, Y y Z son diferentes grupos acilo y son ya sea un grupo acetilo o un grupo propionilo; cuando Z es un grupo acetilo, Y y Z son diferentes fracciones, y son ya sea H o un grupo propionilo; y cuando X es un grupo propionilo, Y y Z son fracciones diferentes, y son ya sea H o un grupo acetilo.

Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención incluyen los derivados de acilo que tienen grupos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, usualmente de 1 a 3 átomos de carbono, saturados o insaturados, generalmente saturados, incluyendo, por ejemplo, acetilo, propionilo, isopropilo, butionilo, y similares. Los derivados de polisacárido des-N-acetilados además incluyen derivados de acilo mixtos que contienen uno o mas sitios des-N-acilados, en donde los derivados de polisacárido des-N-acetilados incluyen diferentes grupos acilo saturados o insaturados, usualmente saturados.

Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención además incluyen aquéllos que contienen una fracción de lactona, una fracción de ácido siálico cíclico, u otro derivado de ácido siálico, además o en lugar de una o más fracciones de ácido siálico de un derivado de polisacárido des-N-acetilado descrito en la presente. Por ejemplo, los derivados de polisacárido que tienen una fracción de lactona, pueden presentar la estructura:

5

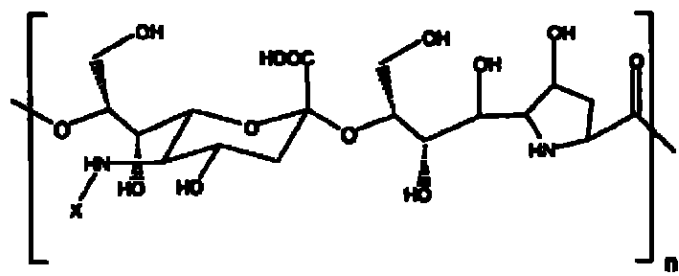


FORMULA VI

en donde X, Y, y n son como se definen anteriormente. Los derivados de polisacárido que tienen una fracción de lactona pueden estar presentes en un heteropolímero que presente uno o más polímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros) que tengan una estructura descrita en la presente.

En otro ejemplo, el derivado de polisacárido des-N-acetilado comprende una imina cíclica y/o se reduce hasta una fracción de amina secundaria cíclica (por ejemplo 1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-pirrolidin-2-il)-etanona) en lugar de la fracción de ácido siálico, y puede presentar la estructura:

20



FORMULA VII

en donde X y n son como se definen anteriormente. Los derivados de polisacárido que tienen una fracción de imina cíclica o

25

una fracción de amina secundaria cíclica, pueden estar presentes en un heteropolímero que comprenda uno o más polímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros) que tengan una estructura descrita en la presente.

5 Cuando el derivado de polisacárido des-N-acetilado se provee como única unidad del epítopo (esto es, dos residuos como se describen anteriormente, o tres residuos como se describen más adelante), el derivado de polisacárido des-N-acetilado normalmente está unido de forma covalente a un portador (por ejemplo, una
10 proteína portadora). En general, y en particular cuando el derivado de polisacárido des-N-acetilado es un disacárido (por ejemplo, como se muestra en la figura 11), un trisacárido, u otra molécula de 3 o menos residuos, el derivado de polisacárido des-N-acetilado puede acoplarse a través de la cetona C2, o después de un tratamiento con
15 peryodato, del aldehído C6 por medio de aminación reductiva a una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora C2-NH o C6-NH). En otras modalidades, la amina está acoplada a los aldehídos en C6, C7 y/o C8 (ver, por ejemplo, las figuras 20-22), que probablemente dé como resultado una oxidación incompleta. El
20 acoplamiento a C7 es más común, el acoplamiento a C6 y C8 es menos común.

Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención además incluyen aquéllos que tienen uno o más residuos que tienen fracciones lípidas unidas (tales como las descritas en la Patente de
25 los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,638,513). Los

derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención también incluyen aquéllos que tienen uno o más residuos que tienen grupos acilo N-grasos unidos (por ejemplo, N-lauroilo, N-oleoil y similares). De interés particular son los derivados de polisacárido en los cuales

5 los residuos que contienen acilo N-grasos, constituyen, por ejemplo, el 50 por ciento de los residuos del derivado de polisacárido de la invención o menos, de tal manera que los derivados de polisacárido resultantes todavía son solubles en agua. Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención también incluyen

10 aquéllos que tienen uno o más residuos de ácido siálico amidados, cuyos residuos tienen una alquil-amina secundaria, usualmente en un extremo no reductor del derivado de polisacárido. Los derivados de polisacárido que tienen uno o más residuos de ácido siálico amidados pueden prepararse, por ejemplo, mediante el acoplamiento

15 de aminas grasas (por ejemplo, dodecil-amina, oleoil-amina, y similares), a un grupo carboxilo C1 por medio de sustitución nucleófila. De interés particular son los derivados de polisacárido en los cuales estos derivados de amida C1 constituyen, por ejemplo, aproximadamente el 50 por ciento de los residuos o menos del

20 derivado de polisacárido. Los derivados de polisacárido des-N-acetilados además incluyen aquéllos conjugados a un portador ya sea en el extremo reductor o no reductor o ambos (por ejemplo, a través del enlace con un residuo en el extremo reductor del derivado, a un residuo en el extremo no reductor del derivado, o ambos).

25 Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención

pueden ser homopolímeros o heteropolímeros con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más unidades de epítopos diméricos (definiendo al epítopo mínimo) tal como se describe anteriormente, cuyas unidades
5 diméricas pueden estar adyacentes o separadas por monómeros o polímeros de residuos de ácidos siálicos o sus derivados. En algunas modalidades, los residuos N-acilados del derivado de polisacárido des-N-acetilado representan menos del 90 por ciento, menos del 85 por ciento, menos del 84 por ciento, menos del 80 por ciento, menos
10 del 75 por ciento, menos del 70 por ciento, menos del 60 por ciento, o menos del 55 por ciento de los residuos totales del compuesto.

En otras modalidades la proporción de los residuos des-N-acetilados a los residuos N-acilados es de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, o 5:1 o más. En las modalidades específicas, la proporción de los residuos
15 des-N-acetilados a los residuos N-acetilados es de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, o 5:1 o más. En otras modalidades específicas, la proporción de los residuos des-N-acetilados a los residuos N-propionilados es de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, o 5:1 o más. En otras modalidades específicas, la proporción de los residuos des-N-acetilados a los residuos N-
20 alquilados es de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, o 5:1 o más. En otras modalidades específicas, la proporción de los residuos des-N-acetilados a los residuos N-acetilados es de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, o 5:1 o más.

Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención
25 pueden proporcionarse como una composición que es homogénea o

heterogénea con respecto a los derivados de polisacárido des-N-acetilados contenidos. Por ejemplo la invención contempla las composiciones que contienen los derivados de polisacárido des-N-acetilados que son homogéneos o heterogéneos con respecto a una
5 o más de las estructuras de epítipo dimérico, la posición del epítipo dimérico dentro del derivado de polisacárido des-N-acetilado, la presencia o ausencia de una proteína portadora conjugada, la Dp, el peso molecular, la proporción de los residuos des-N-acilados a N-acilados, el grado de N-acilación (por ejemplo, el grado de N-acetilación o N-propionilación), y similares.
10

Se entenderá que el polisacárido des-N-acetilado de la presente invención puede modificarse para proporcionar una variedad de atributos deseados, por ejemplo, mejores características farmacológicas, mientras que aumenta o cuando menos
15 substancialmente retiene toda la antigenicidad o inmunogenicidad de los polisacáridos des-N-acetilados no modificados. Por ejemplo, los polisacáridos pueden modificarse al extender, disminuir el número de residuos en el polímero (por ejemplo, para proporcionar diferentes grados de polimerización (Dp)): Con "Dp" se implica el número de
20 residuos de un polímero.

Las sustituciones con diferentes residuos, ya sea naturales o no, pueden realizarse por ejemplo como resultado de la modificación química durante la des-N-acetilación, la N-acilación, y similares. Por ejemplo los derivados de polisacárido de la invención pueden
25 modificarse por medio de una fracción lipídica (como se describe por

ejemplo, en los Ejemplos 1 y 5 que se encuentran más adelante, y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,638,513 (Seid)), conjugados a un portador (por ejemplo, ya sea en el extremo reductor como en el no reductor) y pueden contener
5 lactona, ácido siálico cíclico, imina y estructuras de imina reducidas. En otro ejemplo, los derivados de polisacárido de la invención pueden modificarse por medio de la unión de grupos acilo N-grasos (por ejemplo N-lauroilo, N-oleoil, y similares). En otro ejemplo, los derivados de polisacárido de la invención pueden incluir uno o más
10 residuos de ácido siálico que tienen una alquil-amina secundaria (por ejemplo, derivados de amida C1), que pueden prepararse, por ejemplo, mediante el acoplamiento de aminas grasas (por ejemplo, dodecil-amina, oleoil-amina, y similares) a un grupo queto C1 por medio de sustitución nucleófila.

15 Los polisacáridos des-N-acetilados empleados en la presente invención no necesitan ser idénticos a los descritos en la sección de Ejemplos que se encuentra más adelante, siempre y cuando los polisacáridos des-N-acetilados en cuestión puedan inducir una respuesta inmune en un huésped que provoque la producción de
20 anticuerpos que se enlacen de manera selectiva al polisacárido capsular de *N. meningitidis*, con poco o ningún enlace significativo a los antígenos del huésped (por ejemplo, al poli-ácido siálico del huésped (PSA)): Por consiguiente, alguien experto en la técnica reconocerá que un número de derivados (descritos en más detalle a
25 continuación), pueden realizarse sin afectar de manera sustancial la

actividad de los polisacáridos des-N-acetilados.

Métodos para hacer los derivados de polisacárido des-N-acetilados

En general, los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención pueden producirse por medio de des-N-acetilación de un polisacárido de *N. meningitidis* o K1 de *E. coli* u otra fuente adecuada de polisacárido bacteriano, seguida por la re-N-acilación parcial. La re-N-acilación parcial promueve la producción de un derivado de polisacárido des-N-acetilado que tiene menos del 90 por ciento, menos del 85 por ciento, menos del 84 por ciento, menos del 80 por ciento, menos del 75 por ciento, menos del 70 por ciento, menos del 60 por ciento, o menos del 55 por ciento, generalmente aproximadamente 10 por ciento, aproximadamente 15 por ciento, aproximadamente 16 por ciento, aproximadamente 20 por ciento, aproximadamente 25 por ciento, aproximadamente 30 por ciento, aproximadamente 40 por ciento, o aproximadamente 45 por ciento de residuos N-acilados en relación con los residuos totales del compuesto. A este respecto, la invención proporciona el control del nivel de acilación del producto final, de tal forma que se proporciona un polisacárido des-N-acetilado que tiene el nivel deseado de acilación. En general la re-acilación se controla o se previene al limitar la cantidad del reactivo acilante.

Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención pueden producirse también por medio de la des-N-acetilación de un polisacárido de *N. meningitidis* o K1 de *E. coli*, u otra fuente

adecuada de polisacárido bacteriano, seguida por la re-N-acilación con una mezcla de grupo protegido con amina y grupos acilo (por ejemplo, grupos trihaloacetilo y acetilo) en una proporción deseada, de tal forma que el derivado de polisacárido contenga menos del 90 por ciento, menos del 85 por ciento, menos del 84 por ciento, menos del 80 por ciento, menos del 75 por ciento, menos del 70 por ciento, menos del 60 por ciento, menos del 55 por ciento de residuos protegidos con amina, usualmente aproximadamente 10 por ciento, aproximadamente 15 por ciento, aproximadamente 16 por ciento, aproximadamente 20 por ciento, aproximadamente 25 por ciento, aproximadamente 30 por ciento, aproximadamente 40 por ciento, o aproximadamente 45 por ciento residuos protegidos con amina (por ejemplo, residuos N-trihaloacilados) en relación a los residuos totales del compuesto (en donde el compuesto generalmente contiene cuando menos 10 o cuando menos 20 residuos). A este respecto la invención provee el control del nivel de acilación del producto final después de retirar el grupo de protección de amina y evitar las reacciones secundarias indeseables con los grupos amino libres, para proporcionar un polisacárido des-N-acetilado que tiene un nivel deseado de acilación. El retiro de los grupos de protección de amina para una amina libre del residuo desprotegido. En general, la proporción de los residuos des-N-acetilados se controla al limitar la cantidad de reactivo de protección de amina (por ejemplo, la cantidad de reactivo trihaloacilante).

Los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención

puede también producirse por medio de biosíntesis de un polisacárido de *N. meningitidis* o K1 de *E. coli*, u otra fuente adecuada de polisacárido bacteriano, en la cual los medios de crecimiento bacterianos se suplementa con una mezcla de una
5 manosamina protegida con amina (por ejemplo, N-trihaloacil-manosamina) y acil-manosamina (por ejemplo N-trihaloacetil- y N-acetil-manosamina) en una proporción deseada tal que el derivado de polisacárido expresado por las bacterias contenga menos del 90 por ciento, menos del 85 por ciento, menos del 84 por ciento, menos
10 del 80 por ciento, menos del 75 por ciento, menos del 70 por ciento, menos del 60 por ciento, o menos del 55 por ciento de residuos protegidos con amina (por ejemplo, N-trihalo-acilados) en relación al total de los residuos producidos de polisacárido.

A este respecto, la invención provee el control del nivel de
15 acilación del producto final después del retiro del grupo de protección de amina y evitar las indeseables reacciones secundarias con los grupos amino libres, para proporcionar un polisacárido des-N-acetilado que tenga un nivel deseado de acilación. En general, la proporción de los residuos des-N-acetilados se controla al limitar la
20 cantidad de reactivo de manosamina protegido con amina (por ejemplo, N-trihalo-acetil-manosamina).

Los polisacáridos, incluyendo NmB PS y K1 de *E.coli*, son moléculas ejemplares adecuadas para usarse en los derivados y conjugados de polisacáridos y otras moléculas en la invención, y
25 estos materiales de partida son conocidos en la técnica, así como los

métodos para su aislamiento y conjugación con un portador.

Los derivados de polisacárido des-N-acetilados pueden generarse a través de cualquier medio convencional. Por ejemplo en una modalidad la des-N-acetilación de un polisacárido puede
5 lograrse al poner en contacto un polisacárido nativo con un medio acuoso básico a temperaturas elevadas, por ejemplo de aproximadamente 90° C a 110° C, y a un pH de aproximadamente 13 a aproximadamente 14 (por ejemplo, en hidróxido de sodio a una concentración de aproximadamente 2M). Alternativamente, puede
10 usarse hidrazina en solución acuosa. El grado de des-N-acetilación en esta etapa puede variar, siendo de interés cuando menos aproximadamente 85 por ciento, aproximadamente 90 por ciento, aproximadamente 95 por ciento, o aproximadamente 99 por ciento, hasta aproximadamente 100 por ciento de des-N-acetilación. El
15 producto des-N-acetilado puede recuperarse, por ejemplo, mediante enfriamiento, neutralización, purificación si se desea, y liofilización.

Los métodos de producción no acuosos y biosintéticos se describen más detalladamente más adelante, así como en los Ejemplos.

20 Métodos de producción no acuosos

En una modalidad de interés particular, los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención se producen en un solvente orgánico prótico polar que contiene menos del 5 por ciento de agua. Los inventores han descubierto que los métodos a base de
25 soluciones acuosas usados para preparar derivados de NmB PS

(como por ejemplo, en el Ejemplo 1), producen cantidades relativamente pequeñas de materiales que reaccionan con los anticuerpos monoclonales de protección no auto-reactivos (por ejemplo SEAM 2,3). Sin querer apegarse a una teoría, este bajo
5 rendimiento es el resultado de uno o varios de los siguientes: las fallas para retirar todos los grupos N-acetilo antes descritos, las fallas para controlar de forma cuantitativa la cantidad de re-N-acilación debido a la baja reactividad de los grupos amino del polisacárido (formación de pares de carga intramolecular COO^- y
10 NH_3^+), la hidrólisis competitiva del reactivo acilante, y/o la oxidación del grupo amino por medio de peryodato cuando se preparan los aldehídos finales no reductores.

Los inventores han encontrado que la realización de la acilación del polisacárido en un solvente orgánico prótico polar, y en
15 donde se desee, en la presencia de una pequeña cantidad de agua (por ejemplo, formamida, formamida mixta/agua al 2.5 por ciento, y similares), grupos amino de protección (por ejemplo con una trihaloacil-(por ejemplo, tricloroacetil- o trifluoroacetil-)amida) que después se retira para generar fracciones predecibles de los
20 residuos de des-N-acetilo, y el uso de una base fuerte (por ejemplo, hidróxido o metóxido de sodio) durante el paso de acilación, para asegurar que la reactividad de grupo amino proporcione rendimientos mejorados y mejor control de la fracción de los residuos que uno des-N-acetilado).

25 El solvente orgánico puede ser cualquier solvente adecuado,

usualmente un solvente orgánico polar prótico o aprótico. Ejemplos de estos solventes incluyen formamida, dimetilformamida, formamida/dimetilformamida mixtas, y similares o mezclas de solvente orgánico y un pequeño porcentaje de agua (típicamente 5 cuando menos aproximadamente el 2 por ciento o el 2.5 por ciento de agua, pero generalmente menos de 10 por ciento, o menos del 5 por ciento). Se agrega el agua necesaria para asegurar la solubilidad de los componentes, particularmente del polisacárido.

Los grupos amina de la molécula se protegen al modificarlos 10 con un grupo de protección de amina adecuado. Los grupos de protección de amina de ejemplo se describen anteriormente, e incluyen, sin limitación, un carbamato o amida, incluyendo N-alquil- y N-aril-aminas, derivados de imina, derivados de enamina, N-sulfonilo, y similares. En una modalidad de interés particular, los 15 grupos de protección de amina son una trihaloacil-amida, usualmente grupos trihaloacilo con 2 a 12 átomos de carbono, más usualmente con 2 a 10 átomos de carbono, más usualmente con 2 a 8 átomos de carbono, más usualmente con 2 a 6 átomos de carbono, y muy generalmente un grupo protector de trihaloacetilo o trihalopropionilo. 20 Esos grupos de protección se seleccionan preferentemente para la estabilidad a un pH de 8 o menor, la estabilidad en la presencia de peryodato, y la facilidad de retiro como se describe más adelante. En general, el grupo de protección de amina previene la N-oxidación en la presencia de peryodato. La forma del derivado de polisacárido 25 producido después de este paso de protección se refiere aquí como

el "derivado de polisacárido protegido" o el "derivado de polisacárido acilado protegido", en el cual el derivado de polisacárido comprende uno o más grupos de protección de amina (por ejemplo, grupos amina protegidos por trihaloacilo).

5 En general, la producción de un derivado de polisacárido protegido se logra al poner en contacto una molécula de polisacárido cuando menos parcialmente des-N-acetilada con un grupo de protección de amina y un reactivo acilante en la presencia de un solvente orgánico tal como se describe anteriormente. El reactivo de
10 protección de amina puede ser, por ejemplo, un reactivo trihaloacilante, por ejemplo son de interés particular el anhídrido trihaloacético o los ésteres alquil-trihaloacéticos (por ejemplo, anhídrido tricloroacético, anhídrido trifluoroacético, etil-trifluoro-acetil-éster, o etil-tricloro-acetil-éster, y similares). Los reactivos
15 acilantes proporcionan un grupo acilo activado, en el cual el grupo acilo activado es generalmente un grupo acetilo o un grupo propionilo, más generalmente un grupo acetilo. Preferentemente, el reactivo trihaloacilante y los reactivos acilantes se ponen en contacto con la molécula de polisacárido des-N-acetilado en forma
20 de mezcla.

 Las cantidades relativas de reactivo trihaloacilante y de reactivo acilante en la mezcla se proveen de tal forma que el producto final del paso de protección contenga la proporción deseada de residuos trihaloacilados y residuos acilados en el
25 derivado de polisacárido, en el cual los grupos trihaloacilados

normalmente se retirarán para proporcionar una amina libre en el producto final. Por ejemplo, cuando la proporción de las aminas libres a los residuos acilados en el producto final del derivado de polisacárido des-N-acetilado es de aproximadamente 1:10, 1:4 o 1:1, la proporción del reactivo trihaloacilante al reactivo acilante está aproximadamente presente en la mezcla en una proporción de aproximadamente 1:10, 1:4 o 1:1. Dicho de otra manera, la cantidad de reactivo trihaloacilante en la mezcla es casi igual a la fracción de los grupos N-acetilo deseados en el producto derivado de polisacárido des-N-acetilado final, después de la desprotección (por ejemplo, 10 por ciento, 25 por ciento, 50 por ciento, y similares). El reactivo acilante también puede proporcionarse como una mezcla de diferentes grupos acilo activados (por ejemplo acetilo, propionilo) para proporcionar una proporción deseada de diferentes grupos acilados en el derivado de polisacárido. Por ejemplo, cuando el derivado de polisacárido deba tener una proporción de residuos acetilados a residuos propionilados de 2:1 o 1:1, los agentes acilantes para los grupos acetilo y propionilo activados se proporcionan en una proporción igual o similar en la mezcla de agentes acilantes.

Después del paso de protección, el derivado de polisacárido protegido puede entonces modificarse según se desee. Por ejemplo, el derivado de polisacárido protegido puede conjugarse a un portador deseado, por ejemplo por medio de peroxidación seguida por la animación reductiva. Los grupos protectores pueden entonces

retirarse (por ejemplo, por medio de hidrólisis o reducción) para dejar un amina libre, proporcionando de esta manera el producto derivado de polisacárido des-N-acetilado final. Los grupos de protección de amina pueden retirarse ya sea mediante hidrólisis
5 usando una base acuosa fuerte (por ejemplo pH de 9 o mayor), mediante reducción (por ejemplo, con borohidruro de sodio), o por medio de la amina agregada durante la preparación de conjugados por medio de aminación reductiva (por ejemplo, ver el Ejemplo 5). El derivado de polisacárido puede entonces aislarse de acuerdo con los
10 métodos bien conocidos en la técnica.

Los métodos de producción no acuosos tienen varias ventajas. Primero, al realizar las reacciones de acilación en un solvente orgánico, se proporciona mayor flexibilidad en el tipo de grupos acilo que pueden usarse. Por ejemplo, el uso de un solvente orgánico
15 facilita el uso de grupos de acilo grasos mayores a 4 carbonos que representan problemas con respecto a la solubilidad en sistemas acuosos, así como grupos acilo activados altamente reactivos (por ejemplo, trifluoroacetilo y tricloroacetilo). La reacción en solvente orgánico también proporciona un mayor control sobre el grado de
20 acilación, ya que no existen reacciones de competencia o si existen son mínimas, con el agua y OH^- , para agotar el reactivo. Como resultado, las reacciones de acilación con el polisacárido pueden diseñarse de tal forma que avancen hasta completarse.

El planteamiento no acuoso también permite el uso de grupos
25 amina protegidos. Cuando se dejan sin proteger, los grupos amina de

polisacáridos pueden participar en otras reacciones indeseadas tales como oxidación en la presencia de peryodato y reacciones intramoleculares con grupos carboxilo activados, o con aldehídos introducidos en el extremo no reductor y la cetona del extremo reductor. Trifluoroacetilo o tricloroacetilo son grupos de protección preferidos ya que son estables a un pH menor a aproximadamente 8, estables en la presencia de peryodato, y pueden fácilmente retirarse en una base acuosa o por medio de reducción con borohidruro de sodio para producir derivados de NmB PS que contienen residuos de des-N-acetilo, en donde el porcentaje de residuos de des-N-acetilo se controla por medio de la cantidad de amina derivada con grupos de protección.

Métodos biosintéticos de producción de derivados de polisacárido

En otra modalidad, los derivados de polisacárido se generan al cultivar bacterias de *N. meningitidis*, en particular bacterias del Grupo B, en la presencia de uno o más derivados de N-acil-manosamina, y bajo condiciones para promover la producción de derivados de polisacárido que tengan residuos de ácido N-acil-siálico. Esto puede lograrse al incluir en el medio de cultivo bacteriano, un derivado de manosamina que tenga un grupo N-acilo deseado.

En una modalidad el derivado de N-acil-manosamina es una manosamina que contiene un grupo de protección de amina (una "manosamina protegida" o "manosamina protegida con amina")

ejemplificados aquí por las N-trihaloacil-manosaminas, para lograr la "la alimentación del derivado de manosamina a las bacterias". Las manosaminas protegidas con amina ejemplares que son adecuadas para usarse en la invención incluyen cualquier manosamina protegida con amina que pueden incorporarse en la senda sintética del polisacárido de la bacteria para proveer la producción de un derivado de polisacárido protegido. Los reactivos de manosamina protegidos con amina ejemplares N-trihaloacil-manosamina, por ejemplo N-trihaloacetil-manosamina (por ejemplo, N-tricloroacetil-manosamina, trifluoroacetil-manosamina), N-formil-manosamina, y similares). En adición a la manosamina protegida con amina, el medio de cultivo generalmente también incluye una N-acetil-manosamina, para proporcionar un derivado de polisacárido que tenga tanto residuos de ácido siálico protegidos como residuos de ácido siálico n-acetilados.

Sin querer apegarse a una teoría, cuando se cultivan en la presencia de la manosamina protegida con amina, las enzimas bacterianas involucradas en la biosíntesis de cápsula incorporan la manosamina protegida con amina en el ácido siálico, que entonces se incorpora en el polisacárido de la cápsula. Los métodos de fermentación y purificación estándar pueden usarse para generar un derivado de NmB PS protegido que contenga una fracción deseada de monómeros que tengan grupos de protección unidos. Los derivados de polisacárido que contienen estos grupos de protección pueden tener las estructuras descritas anteriormente.

En una modalidad relacionada, en donde se desee un derivado de polisacárido que tenga residuos mixtos de ácido N-acil-siálico mixtos, el medio de cultivo incluye reactivos mixtos de N-acil-manosamina. Por ejemplo, la N-acil-manosamina puede comprender

5 grupos acilo saturados o insaturados, usualmente grupos acilo saturados con de 1 a 5 átomos de carbono, más usualmente con 2 a 5 átomos de carbono, más usualmente con 2 a 4 átomos de carbono, más usualmente con 2 a 3 átomos de carbono, siendo los grupos acetilo o propionilo de un interés particular. El cultivo de las

10 bacterias en la presencia de estos reactivos mixtos de N-acil-manosamina puede proveer la producción de un derivado de polisacárido que tiene residuos mixtos de ácido N-acil-siálico, por ejemplo ácido N-acetil-siálico, ácido N-propionil-siálico y similares. En una modalidad de interés particular, las bacterias se cultivan en

15 la presencia de una mezcla de una manosamina protegida (por ejemplo una N-trihaloacil-manosamina) y N-acil-manosaminas (por ejemplo, una mezcla de N-acetil-manosamina y N-propionil-manosamina).

En una modalidad de interés particular, una bacteria de *N. meningitidis*, preferentemente una cepa del Grupo B, se cultiva en la

20 presencia de una mezcla de una N-acil-manosamina (por ejemplo N-acetil-manosamina) y una N-trihaloacil-manosamina. En las modalidades de interés particular, las bacterias son de una cepa no encapsulada, y puede ser una cepa que presente una síntesis de

25 capsula de polisacárido defectuosa en ausencia de N-acetil-

aminosamina complementaria en el medio de cultivo (por ejemplo, debido a un defecto en una o más enzimas de tal forma que la bacteria no pueda sintetizar el polisacárido de la cápsula a menos que el medio de crecimiento se complemente con N-acetil-
5 manosamina). Por ejemplo, la cepa puede estar defectuosa en N-acetil-D-glucosamina-6-fosfato-2-epimerasa, tal como en la cepa M7 de NmB.

Las cantidades relativas de reactivos de manosamina en el cultivo (por ejemplo, la proporción de N-trihaloacil-manosamina y N-
10 acetil-manosamina) se proveen de tal forma que el producto biosintético final contiene la proporción deseada de residuos y/o derivados de ácido siálico diferentes en el derivado de polisacárido (por ejemplo residuos trihaloacilados y residuos acilados en el derivado de polisacárido). En general, los grupos de protección (por
15 ejemplo los grupos trihaloacilados) se retiran para proporcionar una amina libre en el producto derivado de polisacárido final. Por ejemplo, cuando la proporción de las aminas libres a los residuos acilados en el producto derivado final de polisacárido des-N-acetilado debe ser de 1:10, 1:4, o 1:1, la proporción de N-trihaloacil-
20 manosamina a manosamina es de aproximadamente 1:10, 1:4 o 1:1. Dicho de otra manera la cantidad de N-trihaloacil-manosamina en el cultivo es casi igual a la fracción de los grupos de ácido des-N-acetil-siálico deseados en el producto final de derivado de polisacárido des-N-acetilado después de la desprotección (por
25 ejemplo 10 por ciento, 25 por ciento, 50 por ciento y similares).

De manera similar, se pueden proporcionar las cantidades relativas de N-acil-manosaminas "no protegidas" (manosaminas que no contienen un grupo de protección de amina, pero que pueden comprender, por ejemplo, un grupo acetilo o propionilo como el grupo N-acilo) en el cultivo, para proporcionar una proporción deseada de
5 residuos de ácido siálico diferentemente acilados en el derivado de polisacárido. Por ejemplo, cuando el derivado de polisacárido deba tener una proporción de residuos acetilados a residuos propionilados de 2:1 a 1:1, se proporcionan la N-acetil-manosamina y la N-propionil-manosamina en una proporción igual o similar en el cultivo.
10

Los derivados de polisacárido pueden entonces aislarse de las bacterias usando métodos conocidos en la técnica. Cuando el derivado de polisacárido contiene un grupo de protección de amina, estos derivados de polisacárido son especialmente adecuados para
15 generar un derivado de polisacárido que tenga una modificación adicional, por ejemplo un conjugado (por ejemplo por oxidación de peryodato del extremo no reductor) o para modificar un residuo de ácido siálico para proporcionar una alquil-amina secundaria, particularmente una amida C1, en un extremo no reductor y del
20 derivado de polisacárido. Después de que se termine la modificación, los grupos de protección de trihaloacilo pueden ser retirados según lo descrito anteriormente. Por ejemplo, los grupos de protección pueden ser retirados mediante la aminación reductora (por ejemplo, con cianoborohidruro de sodio) o la reducción adicional (por ejemplo,
25 con el borohidruro de sodio o el tratamiento con una base a un pH de

9 o mayor) para proporcionar una amina libre.

Fragmentos, reacilación, y otras modificaciones

Los fragmentos de polisacáridos generalmente se producen como resultado de la N-desacetilación, cuyos fragmentos
5 generalmente tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3,000 a aproximadamente 50,000 Dáltones. Aunque la invención contempla el uso de los derivados de longitud completa de polisacárido así como sus fragmentos, los derivados de fragmentos de polisacárido pueden ser de interés particular.

10 Cuando se desee, se puede llevar a cabo la re-acilación para proporcionar los derivados de polisacárido des-N-acetilados de la invención, al resuspender el polisacárido des-N-acetilado en un medio acuoso a aproximadamente un pH de 8 a 9 (por ejemplo, en hidróxido de sodio), seguida por la adición de un anhídrido de acilo
15 apropiado. En una modalidad, tanto el polisacárido como el agente acilante (por ejemplo anhídrido de acetilo o anhídrido propiónico) se proveen en una mezcla de solvente orgánico/agua (por ejemplo, 2 por ciento (volumen/volumen) de agua en formamida o dimetilformamida). Esta modalidad en particular proporciona niveles
20 más controlados de re-acilación. El método de la invención incluye el uso de menos de 1 equivalente molar, menos de 0.75 equivalente molar, menos de 0.5 equivalente molar, menos de 0.25 equivalente molar, menos de 0.1 equivalente molar, menos de 0.05 equivalente molar, menos de 0.025 equivalente molar, o hasta 0.02 equivalente
25 molar de anhídrido de ácido o agente acilante (por ejemplo, el éster

activo de acilo tal como O-acil-hidroxisuccinimida).

Los grupos O-acilo pueden retirarse al aumentar el pH a aproximadamente 12. El pH entonces se reduce a aproximadamente 8 (por ejemplo por medio de la adición de ácido clorhídrico), y el derivado se purifica según se desee, por ejemplo por medio de diálisis. Los productos de reacción pueden además purificarse y liofilizarse según se desee.

El grado de N-acilación de los derivados de polisacárido des-N-acetilados resultantes es generalmente menor al 90 por ciento, menor al 85 por ciento, menor al 84 por ciento, menor al 80 por ciento, menor al 75 por ciento, menor al 70 por ciento, menor al 60 por ciento, o menor al 55 por ciento, generalmente mayor al 10 por ciento, 15 por ciento, 16 por ciento, 25 por ciento, 30 por ciento, 40 por ciento, o 45 por ciento. El peso molecular de los derivados de polisacárido des-N-acetilados puede variar, estando los derivados de polisacárido des-N-acetilados descritos en la presente, en el intervalo de pesos moleculares de desde aproximadamente 0.5 kDa (por ejemplo, un disacárido) a 80 kDa, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 70 kDa, de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 60 kDa, de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 50 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 25 kDa, de aproximadamente 10 kDa a 80 kDa, de aproximadamente 20 kDa a 60 kDa, de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 50 kDa, generalmente de aproximadamente 0.5 kDa a aproximadamente 10 kDa.

Conjugados de polisacárido des-N-acetilados

El polisacárido des-N-acetilado o preferentemente un polisacárido de amina protegida, puede conjugarse a un portador para proporcionar un complejo de polisacárido des-N-acetilado-
5 portador. El complejo conjugado de polisacárido-portador puede comprender múltiples moléculas portadoras, múltiples moléculas de polisacárido, o ambos.

Como se observa anteriormente, el derivado de polisacárido del conjugado puede proporcionarse en forma de un dímero que
10 define un epítipo mínimo como se describe anteriormente, o como una unidad polimérica (por ejemplo, dos o más unidades dimericas que definen el epítipo descrito anteriormente). Cuando el derivado de polisacárido es una estructura polimérica, el derivado de polisacárido puede ser homopolimérico o heteropolimérico. La
15 composición puede comprender residuos adicionales unidos al término no reductor, al término reductor, o ambos términos reductor o no reductor de un polisacárido des-N-acetilado o preferentemente un derivado de polisacárido protegido con amina.

En una modalidad, el portador es una proteína, un péptido, un
20 auxiliar de células-T, o cualquier otro compuesto capaz de mejorar la respuesta inmune. La proteína puede seleccionarse del grupo consistente en, pero no limitado a, proteínas virales, bacterianas, parasitarias, animales, y micóticas. En una modalidad, el portador es albúmina. Alternativamente, el portador es el toxoide tetánico, el
25 toxoide diftérico, complejos de proteína de la membrana exterior

meningocócica (ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 4,707,543; US 6,476,201; US 6,558,677), o una proteína exterior bacteriana (tal como porina B recombinante de *N. meningitidis*). Esos portadores pueden obtenerse
5 de compañías proveedoras bioquímicas o farmacéuticas o se pueden preparar por medio de metodología estándar (Cruse, J. M. (ed.) *Conjugate Vaccines in Contributions to Microbiology and Immunology* vol. 10 (1989)). Los péptidos sintéticos que contienen epítopos de célula-T adecuados para usarse como portadores pueden incluir
10 epítopos de células-T "universales" (Panina-Bordignon y colaboradores, 1989 *Eur. J. Immunol.* 19: 2237) o péptidos de epítopos Pan Dr no naturales (PADRE) (del Guercio y colaboradores, 1997 *Vaccine* 15: 441). Otros agentes incluyen otras proteínas que pueden funcionar como portadores, los cuales serían conocidos por
15 aquéllos con experiencia normal en la técnica inmunológica.

Los métodos ejemplares de conjugación de los derivados de polisacárido de la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a, los polisacárido conjugados, tales como los descritos en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica
20 Números 4,727,136; 5,811,102 (que describe un conjugado de polisacárido derivado de N-acilo de 3 a 5 átomos de carbono, insaturado, meningocócico, del Grupo B); US 5,969,130; y US 6,080,589. Por ejemplo, la conjugación puede lograrse al introducir un grupo aldehído en el extremo no reductor, en el extremo reductor,
25 o en ambos, del derivado de polisacárido des-N-acetilado, para

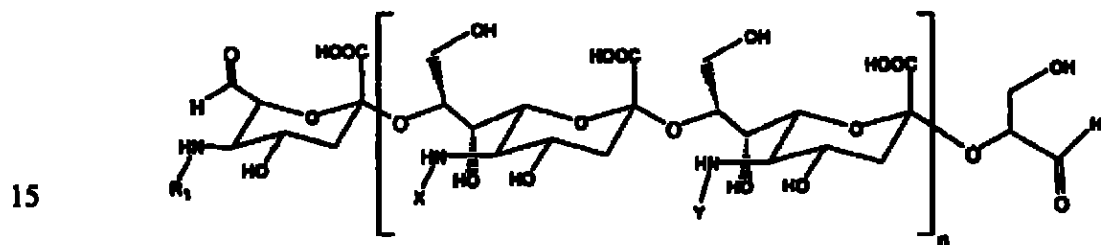
usarse en unión covalente de una o más proteínas portadoras. Esto puede obtenerse por medio de la peryodación al poner en contacto el polisacárido o el derivado de polisacárido con, por ejemplo, *meta*-peryodato de sodio.

5 Cuando el derivado de polisacárido des-N-acetilado comprende un grupo amino no derivado, ciertas restricciones pueden imponerse a los procedimientos que pueden ser usados para acoplar el derivado de polisacárido des-N-acetilado a un portador, tal como una proteína portadora. En esta modalidad, el portador generalmente se modifica
10 para contener uno o más grupos azida (hidrazida o dihidrazida adípica) por medio de la reacción de hidrazida o dihidrazida adípica con el la proteína portadora activada en los grupos carboxilo con EDAC (ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,632,437). Ya que el pKa del grupo amino de
15 hidrazida es de aproximadamente 2.5, y ya que las hidrazidas son fuertemente nucleófilas, la reacción de conjugación de imina puede realizarse a un pH de aproximadamente 5.5 a 7.5 en la cual las aminas primarias en la proteína portadora y el polisacárido son sustancialmente completamente protonadas y por lo tanto no
20 reactivas.

Las vacunas de conjugado de derivado de polisacárido-proteína se purifican por medio de cromatografía por exclusión de tamaños (ToyoPerl HW-45F). La concentración de proteína se determina por medio del ensayo de proteína de Lowry, y la cantidad de polisacárido
25 conjugado por medio del ensayo de resorcinol (Svennerholm 1957

Biochim biophys Acta 24: 604). Para asegurar que la proteína y el polisacárido se enlacen de forma covalente, las vacunas conjugadas se resuelven en SDS-PAGE, y la proteína y los polisacáridos se detectan por separado mediante Western blot usando antisuero
 5 policlinal anti-proteína portadora y anticuerpos anti-polisacárido, para detectar el componente de polisacárido.

En un ejemplo, en el cual el derivado de polisacárido des-N-acetilado presenta epítopos diméricos, los derivados de polisacárido des-N-acetilados pueden modificarse para proporcionar unión a un
 10 portador, y tienen la siguiente estructura:

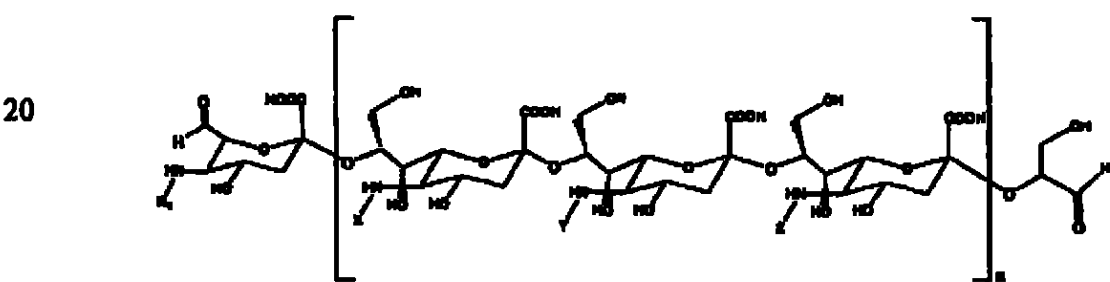


FORMULA VIII

en donde X e Y son como se definen anteriormente, y R_1 es H o
 20 un grupo acilo (por ejemplo un grupo acetilo). En otras modalidades, R_1 se selecciona independientemente a partir de H, un grupo acilo saturado o insaturado (por ejemplo un grupo acilo de 2 a 18 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 16 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 12 átomos
 25 de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 10 átomos

de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 8 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 6 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 4 átomos de carbono saturado o insaturado, o un grupo acilo de 2 a 4 átomos de carbono saturado); un grupo acilo N-graso (por ejemplo, N-lauroílo, N-oleoil, y similares); o una amina grasa (por ejemplo dodecil-
5 amina, oleoil-amina, y similares). En una modalidad, R₁ es un grupo acilo de 4 a 8 átomos de carbono, tal como n-butanóilo, isobutanóilo, n-pentanóilo, n-hexanóilo, n-heptanóilo o n-octanóilo (como se describe en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,576,002), o un grupo acilo Insaturado de 3 a 5 átomos de carbono, tal como los descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,350,449.

En otra modalidad en la cual el derivado de polisacárido des-N-acetilado comprende repeticiones triméricas, el derivado de polisacárido des-N-acetilado puede modificarse para proporcionar la unión a un portador, y tiene la siguiente estructura:



FORMULA IX

en donde:

25 X, Y, y Z son Independientemente H o un grupo de protección

de amina; o un grupo acilo saturado o insaturado (usualmente un grupo acilo saturado), con la condición de que cuando menos uno de X, Y, y Z sea H un grupo trihaloacilo; y cuando menos uno de X, Y, y Z sea un grupo acilo saturado o insaturado, generalmente un grupo acilo saturado, siendo las modalidades de interés particular aquéllas en las cuales cuando menos uno de X, Y, y Z es H (o un grupo de protección de amina), cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acetilo, y cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo propionilo;

n es cuando menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más, generalmente aproximadamente 4 residuos o más, más generalmente aproximadamente 10 residuos o más (por ejemplo, con un grado de polimerización (Dp) de aproximadamente 2 a aproximadamente 60, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, de aproximadamente 30 a aproximadamente 50, de aproximadamente 10 a 20, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18, siendo un Dp de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 de un interés particular); y

R₁ es H, un grupo de protección de amina, o un grupo acilo (por ejemplo un grupo acilo saturado, tal como un grupo acetilo). En otras modalidades, R₁ se selecciona independientemente de H; un grupo de protección de amina, un grupo acilo saturado o insaturado (por ejemplo un grupo acilo de 2 a 18 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 16 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 12 átomos de carbono saturado o

insaturado, un grupo acilo de 2 a 10 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 8 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 6 átomos de carbono saturado o insaturado, un grupo acilo de 2 a 4 átomos de carbono saturado o insaturado, o un grupo acilo de 2 a 4 átomos de carbono saturado); un grupo acilo N-graso (por ejemplo N-lauroilo, N-oleoilo, y similares); o una amina grasa (por ejemplo dodecil-amina, oleoil-amina, y similares). En una modalidad, R₁ es un grupo acilo de 4 a 8 átomos de carbono, tal como n-butanilo, isobutanilo, n-pentanilo, n-hexanilo, n-heptanilo o n-octanilo (como se describe en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,576,002), o un grupo acilo insaturado de 3 a 5 átomos de carbono, tal como los descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,350,449.

**15 Inmunogenicidad de polisacáridos des-N-acetilados y
conjugados de polisacáridos des-N-acetilados**

El polisacárido des-N-acetilado aislado, con o sin posterior conjugación o en la presencia o en la ausencia de una estructura de presentación, puede ser inmunogénico o alternativamente la inmunogenicidad puede surgir de la conjugación. Los métodos para medir la inmunogenicidad son bien conocidos para los expertos en la técnica, e incluyen principalmente la medición del anticuerpo sérico incluyendo mediciones de la concentración, avidéz, y distribución de isotipos en varios momentos después de la inyección de la construcción. La mayor inmunogenicidad puede reflejarse por una

mayor concentración y/o mayor tiempo de vida de los anticuerpos. La inmunogenicidad puede medirse usando ensayos bactericidas *in vitro* así como la capacidad del suero de los animales inmunizados para conferir protección pasiva a la infección o enfermedad en un modelo animal adecuado. La inmunogenicidad puede medirse en la población de pacientes que vayan a ser tratados o en una población que imite la respuesta inmune de la población de pacientes.

Un medio particularmente preferido para determinar la inmunogenicidad de una sustancia dada es la de primero obtener los sueros de un animal (por ejemplo ratón) tanto antes de la inmunización como después de estimular con el polisacárido des-N-acetilado y reforzar con dosis adicionales del conjugado de polisacárido des-N-acetilado. Después de esto la fuerza de los sueros después de la inmunización, que se enlazan al polisacárido des-N-acetilado, se determina usando un ELISA, y se compara con los resultados correspondientes con animales de control falsamente inmunizados.

El polisacárido des-N-acetilado de la invención pueden estimularse para una respuesta inmune a un conjugado de polisacárido que evita los auto-anticuerpos y puede proporcionar una mejor respuesta de los anticuerpos al conjugado de polisacárido, por ejemplo el conjugado de NmB PS, vacuna, comparándose con una respuesta de un individuo no estimulado con el polisacárido des-N-acetilado y que haya sido vacunado con el mismo conjugado de polisacárido.

FORMULACIONES DE COMPOSICIONES ANTIGÉNICAS

"Composición de antígenos", "composición antigénica" o "composición inmunogénica" se usa aquí por conveniencia para referirse genéricamente a composiciones que contienen un polisacárido des-N-acetilado o conjugado de la invención. Las composiciones que comprenden un NmB PS o conjugado de NmB PS des-N-acetilado, o ambos, son de un interés particular. Las composiciones útiles para producir anticuerpos contra NmB, K1 de *E.coli*, o células cancerosas son contempladas por la presente invención.

Las composiciones de la invención usadas como vacunas contienen una cantidad inmunológicamente efectiva de antígeno así como cualquier otro componente compatible según se necesite. Con "cantidad inmunológicamente efectiva" se implica que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie de composiciones antigénicas iguales o diferentes, es efectiva para producir una respuesta de anticuerpos efectiva para el tratamiento o la prevención de un síntoma de, o enfermedad causada por ejemplo por, una infección por *Neisseria*, particularmente *N. meningitidis*, más particularmente el Grupo B de *N. meningitidis*; o por infección por K1 de *E. coli*. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que va a ser tratado, de la edad, del grupo taxonómico del individuo que va a ser tratado (por ejemplo humano, primate no

humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmune del individuo para producir anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la determinación de la situación medica por parte del medico tratante, y de otros factores
5 relevantes. Se espera que la cantidad caerá en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse por medio de pruebas de rutina. El tratamiento de dosificación puede ser un esquema de una sola dosis o de múltiples dosis (por ejemplo incluyendo las dosis de refuerzo). La vacuna puede administrarse en conjunto con otros
10 agentes inmuno-reguladores.

Las composiciones de la invención pueden proporcionarse en un excipiente farmacéuticamente aceptable que puede ser una solución tal como una solución acuosa, frecuentemente una solución salina, o puede proporcionarse en forma de polvo. Las
15 composiciones de la invención pueden contener un derivado de polisacárido des-N-acetilado de la invención y un auxiliar. Los ejemplos de los adyuvantes adecuados conocidos que pueden usarse en humanos, incluyen pero no se limitan necesariamente a, alumbre, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, MF59 (4.3 por ciento en
20 peso/volumen de escualeno, 0.5 por ciento en peso/volumen de Tween 80, 0.5 por ciento en peso/volumen de Span 85), ácido nucleico que contiene CpG (en donde la citosina no está metilada), QS21, MPL, 3DMPL, extractos de Aquilla, ISCOMS, mutantes LT/CT, micro-partículas de poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLG), Quil A,
25 interleucinas, y similares. Para los animales experimentales, se

puede usar solución de Freund, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, llamado como nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-
5 fosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, llamada MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A de monosfosforilo, dimicolato de trehalosa, y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2 por ciento de escualeno/
10 Tween 80. la efectividad de un auxiliar puede determinarse mediante la medición de la cantidad de anticuerpos dirigidos contra el antígeno Inmunogénico.

Otros adyuvantes ejemplares para mejorar la efectividad de la composición incluyen, pero no se limitan a: (1) formulaciones de emulsiones de aceite en agua (con o sin otros agentes Inmuno-
15 estimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (ver más adelante) o componentes de paredes celulares bacterianas), tales como por ejemplo (a) MF59^{MR} (Publicación Internacional Número WO 90/14837; capítulo 10 en Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene
20 5 por ciento de escualeno, 0.5 por ciento de Tween 80, y 0.5 por ciento de Span 85 (que opcionalmente contiene MTP- PE) formulado en partículas sub-micrométricas usando un microfluidizador, (b) SAF, que contiene 10 por ciento de Escualeno, 0.4 por ciento de Tween 80, 5 por ciento de polímero bloqueado con Pluronic L121, y thr-MDP
25 ya sea microfluidizado en un emulsión submicrométrica o

centrifugada para generar una emulsión con tamaños de partícula mayores y (c) sistema adyuvante RIBI^{MR} (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2 por ciento de Escualeno, 0.2 por ciento de Tween 80, y uno o más componentes de pared celular bacterianos tales como monofosfolípidos A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de paredes celulares (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox^{MR}); (2) se pueden usar adyuvantes de saponina, tales como QS21 o Stimulon^{MR} (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o se pueden generar partículas a partir de los mismos, tales como ISCOM (complejos inmuno-estimulantes), cuyos ISCOM pueden estar desprovistos de detergentes adicionales como se describen por ejemplo en la Publicación Internacional Número WO 00/07621; (3) Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (4) citoquinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (Publicación Internacional Número WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo interferones gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) lípido A de monofosforilo (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) por ejemplo Patentes Números GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente en la ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con sacáridos de neumococos por ejemplo en la Publicación Internacional Número WO 00/56358; (6) combinaciones de 3dMPL con por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua por ejemplo en las Patentes Europeas Números EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleótidos

que presentan motivos CpG (Krieg, *Vaccine* 2000, 19, 618-622; Krieg, *Curr opin Mol Ther* 2001 3:15-24; Roman y colaboradores, *Nat. Med*, 1997, 3, 849-854; Weiner y colaboradores, *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis y colaboradores, *J. Immunol.*, 1998, 5 160, 870-876; Chu y colaboradores, *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford y colaboradores, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu y colaboradores, *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224, Krieg y colaboradores, *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman y colaboradores., *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas y 10 colaboradores, *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery y colaboradores, *J. Immunol.*, 1996, 158, 4570-4575; Halpern y colaboradores, *Cell Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto y colaboradores, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey y colaboradores, *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina y 15 colaboradores, *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi y colaboradores, *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi y colaboradores, *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi y colaboradores, *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; y Yi y colaboradores, *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898-5906; Solicitudes de 20 patentes internacionales Números WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 y WO 98/52581] esto es, que contienen cuando menos un dinucleótido CG, en donde la citosina no está metilada; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo en la Publicación 25 Internacional Número WO99/52549; (9) un tensoactivo de éster de

sorbitán de polloxletileno en combinación con un octoxinol (Publicación Internacional Número WO 01/21207) o un tensoactivo de alquil-éter o -éster de polioxietileno en combinación con cuando menos un tensoactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (Publicación Internacional Número WO 01/21152); (10) una saponina y un oligonucleótido inmuno-estimulante (por ejemplo un oligonucleótido CpG) (Publicación Internacional Número WO 00/62800); (11) un inmuno-estimulante con una partícula de sal metálica, por ejemplo Publicación Internacional Número WO 00/23105; (12) una saponina y una emulsión aceite en agua, por ejemplo Publicación Internacional Número WO 99/11241; (13) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IM2 (opcionalmente + un esteroi) por ejemplo Publicación Internacional Número WO 98/57659; (14) otras sustancias que actúan como agentes inmuno-estimulantes para mejorar la eficiencia de las composiciones. Los péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-25-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE), etc.

Las composiciones del antígeno pueden incluir otros componentes, tales como grados farmacéuticos del manitol, lactosa, almidón, estearato del magnesio, sacarina del sodio, talco, celulosa, glucosa, sucrosa, magnesio, carbonato, y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según lo requerido para acercarse a

las condiciones fisiológicas tales como agentes para ajustar el pH y neutralizantes, agentes que ajustan la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato del sodio, cloruro de sodio, cloruro del potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de antígeno en estas formulaciones puede variar extensamente, y se selecciona principalmente en base a los volúmenes fluidos, las viscosidades, el peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente. Las composiciones resultantes pueden estar en la forma de una solución, suspensión, tableta, píldora, cápsula, polvo, gel, crema, loción, ungüento, aerosol o similares.

La concentración de antígenos de la invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, esto es de menos de aproximadamente 0.1 por ciento, usualmente en o cuando menos aproximadamente 2 por ciento, hasta tanto como 20 por ciento a 50 por ciento o más en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

INMUNIZACIÓN

Los PS des-N-acetilados y los conjugados des-N-acetilados pueden usarse solos o en combinación con derivados PS y/o con conjugados PS convencionales. Cuando se usan en combinación las diferentes composiciones pueden proveerse en las mismas formulaciones o en diferentes formulaciones. Cuando se administran en diferentes formulaciones, las composiciones pueden administrarse

con un régimen de dosificación igual o diferente (por ejemplo por medio de rutas iguales o diferentes, al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo en el mismo o en diferentes días)) y similares). En general la administración de PS des-N-acetilados y conjugados des-N-acetilados descritos aquí puede realizarse en serie, al mismo tiempo o como mezcla, como se describe más detalladamente adelante. Preferentemente la administración es en serie con dosis repetidas de la administración de PS des-N-acetilados. Los regímenes de inmunización de ejemplo se describen adelante con más detalle.

En general la inmunización se logra por medio de la administración a través de una vía adecuada, incluyendo la administración de la composición oral, nasal, nasofaríngea, parenteral, entérica, gástrica, tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, en tableta, sólido, pulverizado, líquido, forma del aerosol, local o sistémicamente, con o sin excipientes agregados. Los métodos reales para preparar las composiciones administrables parenteralmente son conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen más detalladamente en las publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 15a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania (1980).

Se reconoce que los PS des-N-acetilados y los compuestos relacionados descritos antes, cuando se administran oralmente deben protegerse de la digestión. Esto se logra típicamente al complejar los PS des-N-acetilados y los conjugados de PS des-N-

acetilados con una composición para volverlos resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática o al empacarlos en un portador resistente apropiado tal como una liposoma. Los medios para proteger un compuesto de interés de la digestión son bien conocidos en la técnica.

Con el fin de mejorar la vida media en el suero, las preparaciones antigénicas que se inyectan también pueden encapsularse, introducirse en el lumen de liposomas, prepararse como coloide, o pueden utilizarse otras técnicas convencionales que proporcionen una vida media en el suero extendida de los péptidos. Una variedad de métodos están disponibles para preparar liposomas, como por ejemplo los descritos por Szoka y colaboradores., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980), patentes norteamericanas Nos. 4,235,871, 4,501,728 y 4,837,028. Las preparaciones también se pueden proporcionar en formas de liberación controlada o de liberación lenta, para liberar y administrar las preparaciones de antígeno como una mezcla en una forma en serie.

Las composiciones se administran a un sujeto en riesgo de adquirir una enfermedad por *Neisseria* para prevenir o cuando menos detener parcialmente el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades eficaces para el uso terapéutico dependerán de por ejemplo, la composición del antígeno, la manera de la administración, el peso y el estado de la salud general del paciente, y el juicio del médico que prescribe.

Las dosis únicas o múltiples de las composiciones del antígeno se pueden administrar dependiendo de la dosificación y de la frecuencia requeridas y toleradas por el paciente, y la vía de administración. En general, la inmunización se proporciona para obtener una respuesta
5 inmune en el paciente, en el cual la invención puede proporcionar la ventaja de que la inmunización no produce los anticuerpos detectables que reaccionan con el poli-ácido siálico en el sujeto, y pueden incluir la producción de los anticuerpos bactericidas para *N. meningitidis* así como para K1 de *E. coli*. Dicho de otra manera, la
10 inmunización con las composiciones de la invención no produce ninguna respuesta de auto-anticuerpos clínicamente relevante dirigida contra el ácido siálico del huésped.

Régimen de inmunización

Los conjugados de polisacárido des-N-acetilados se
15 administran a un huésped de una manera que proporciona la producción de anticuerpos anti-PS selectivos, en particular anticuerpos anti-NmB PS, con una producción de auto-anticuerpos del huésped escasa o no detectable.

En modalidades particulares, las composiciones de antígenos
20 descritas en la presente, se administran en serie. Primero, se administra a un sujeto una dosis inmunogénicamente efectiva de un polisacárido des-N-acetilado (que puede estar conjugado a un portador, y puede tener o no excipientes). La primera dosis generalmente se administra en una cantidad efectiva para producir
25 una respuesta inmune (por ejemplo activación de las células B y/o

T). Las cantidades para la inmunización inicial generalmente se encuentran en el intervalo de aproximadamente 0.001 miligramos a aproximadamente 1.0 miligramos por paciente de 70 kilogramos, más comúnmente de aproximadamente 0.001 miligramos a aproximadamente 0.2 miligramos por paciente de 70 kilogramos, usualmente de aproximadamente 0.005 miligramos a aproximadamente 0.015 miligramos por paciente de 70 kilogramos. Pueden usarse dosis de aproximadamente 0.001 miligramos hasta aproximadamente 10 miligramos por paciente al día, particularmente cuando el antígeno se administra en un sitio apartado y no en la corriente sanguínea, tal como en una cavidad corporal o en el lumen de un órgano. Son posibles dosis sustancialmente mayores (por ejemplo de 10 a 100 miligramos o más) en la administración oral, nasal, o tópica.

Después de la administración de la primera composición de antígenos del polisacárido des-N-acetilado, se administra al sujeto una dosis terapéuticamente efectiva de una segunda composición de antígenos (por ejemplo, polisacárido des-N-acetilado, opcionalmente conjugado, y con o sin excipientes), después de que este sujeto haya sido estimulado inmunológicamente por medio de la exposición a la primera dosis. El refuerzo puede administrarse días, semanas o meses después de la inmunización inicial, dependiendo de la respuesta y condición del paciente.

La existencia de una respuesta inmune ante la primera composición de antígenos puede determinarse por medio de métodos

conocidos (por ejemplo, al obtener suero del individuo antes y después de la inmunización inicial, y demostrando un cambio en el estado inmune del individuo, por ejemplo un ensayo de inmunoprecipitación, o un ELISA, o un ensayo bactericida, o un Western blot, o un ensayo de citometría de flujo, o similares) y/o demostrando que la magnitud de la respuesta inmune a la segunda inyección es mayor que la de los animales de control inmunizados por primera vez con la composición de materia usada para la segunda inyección (por ejemplo, estímulo inmunológico). El estímulo inmunológico y/o la existencia de una respuesta inmune a la primera composición de antígenos también puede asumirse por medio de la espera durante un periodo de tiempo después de la primera inmunización que, basándose en la experiencia previa, sea un tiempo suficiente para que haya tenido lugar una respuesta inmune y/o para que se haya realizado el estímulo, por ejemplo 2, 4, 6, 10, ó 14 semanas. Las dosificaciones de refuerzo de la segunda composición de antígenos típicamente son de aproximadamente 0.001 miligramos a aproximadamente 1.0 miligramos de antígeno, dependiendo de la naturaleza del inmunógeno y de la vía de inmunización.

En ciertas modalidades preferidas, se administra al sujeto una dosis terapéuticamente efectiva de una tercera composición antigénica preparada, después de que el individuo haya sido estimulado y/o haya presentado una respuesta inmune a la segunda composición de antígenos. La tercera composición de antígenos pueden ser un polisacárido des-N-acetilado o un conjugado de

polisacárido des-N-acetilado. El tercer refuerzo puede ser administrado días, semanas o meses después de la segunda inmunización, dependiendo de la respuesta y condición del sujeto.

La existencia de estímulo y/o de una respuesta inmune a la
5 segunda composición de antígenos puede determinarse por los mismos métodos usados para detectar una respuesta inmune a la segunda composición de antígenos. La existencia de estímulo y/o de una respuesta inmune a la segunda composición de antígenos también puede asumirse al esperar un periodo de tiempo después de
10 la segunda inmunización que, basándose en la experiencia previa, sea un tiempo suficiente para que haya tenido lugar una respuesta inmune, por ejemplo 2, 4, 6, 10, ó 14 semanas. Las dosificaciones de refuerzo de la segunda composición de antígenos generalmente son de aproximadamente 0.001 miligramos a aproximadamente 1.0
15 miligramos de antígeno, dependiendo de la naturaleza del inmunógeno y de la vía de inmunización.

La presente invención además contempla el uso de una cuarta, quinta, sexta o mayor inmunización de refuerzo, usando una cuarta, quinta o sexta composición de antígenos.

20 En una modalidad el polisacárido des-N-acetilado o el conjugado de polisacárido des-N-acetilado se administra cuando menos una vez, usualmente cuando menos dos veces, y en algunas modalidades más de dos veces.

En una modalidad, el derivado de polisacárido des-N-acetilado
25 o el conjugado de polisacárido des-N-acetilado se administra como la

primera composición de antígenos para estimular la respuesta inmune. Las composiciones de antígenos subsecuentemente administradas (por ejemplo, las dosis de refuerzo) pueden ser de derivado de polisacárido des-N-acetilado o del conjugado de derivado de polisacárido des-N-acetilado, o pueden ser de una composición de antígenos que refuerce la respuesta inmune estimulada a la primera composición de antígenos, pero cuya composición de antígenos no está necesariamente diseñada para evitar o mitigar una respuesta de auto-anticuerpos en el huésped. En esta modalidad, las composiciones de antígenos administradas después de la dosis de estímulo inicial, pueden ser, por ejemplo, una preparación vesículas (por ejemplo una preparación de vesículas y/o de micro-vesículas de membrana exterior), una preparación de una o más proteínas aisladas de las bacterias de interés (por ejemplo, una preparación que comprenda PorB de *N. meningitidis*), y similares. Sin quererse limitar a la teoría, la dosis de estímulo inicial de un derivado de polisacárido des-N-acetilado o un conjugado del mismo de acuerdo con la invención, dirige la respuesta inmune hacia la producción de anticuerpos que son minimamente reactivos con el antígeno del huésped, y se alejan de la producción de anticuerpos auto-reactivos. Una vez que la respuesta inmune del huésped se estimula de esta manera, entonces la exposición a antígenos que podría de otra forma provocar una respuesta auto-inmune, no dará como resultado la producción sustancial de auto-anticuerpos, aun cuando la dosis de refuerzo contenga el polisacárido N-acetilado.

En una modalidad, las composiciones de antígenos pueden ser administradas a un sujeto mamífero (por ejemplo, humano) que sea inmunológicamente puro con respecto a *Neisseria meningitidis* o K1 de *E. coli*. En una modalidad particular, el mamífero es un niño humano de aproximadamente cinco años o menos, y preferentemente de aproximadamente dos años o menos, y las composiciones de antígenos se administran en cualquiera o más de los siguientes tiempos: dos semanas, un mes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11 meses, o un año, o 15, 18, o 21 meses después del nacimiento, o a los 2, 3, 4, o 5 años de edad.

En general, la administración a cualquier mamífero se inicia preferentemente antes del primer signo de los síntomas de la enfermedad, o al primer signo de una exposición posible o real a una infección o enfermedad (por ejemplo debido a la exposición o infección por *Neisseria* o K1 de *E.coli*).

DIAGNÓSTICOS Y TERAPIAS ESPECIFICAS BASADAS EN EL ANTICUERPO ANTI-PS

Los polisacáridos des-N-acetilados, así como sus derivados y conjugados descritos en la presente, pueden usarse para generar anticuerpos, cuyos anticuerpos pueden usarse como reactivos para usarse en ensayos de diagnóstico y en terapias basadas en anticuerpos. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende anticuerpos que se enlazan selectivamente al polisacárido de *N. meningitidis*, particularmente NmB PS ó PS K1 de *E. coli*, con poco o nulo enlace

detectable al poli-ácido siálico del huésped (esto es, los anticuerpos no son lo suficientemente reactivos con el tejido del huésped). Los anticuerpos anti-PS (particularmente anticuerpos anti-NmB PS, anti-PS K1 de *E. coli*, o anti-células cancerosas) pueden ser
5 monoclonales o policlonales, y pueden estar provistos con un excipiente adecuado. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PS pueden inmovilizarse sobre un soporte, o pueden proveerse en un recipiente tal como un frasco, particularmente un frasco estéril etiquetado para usarse en un método de diagnóstico o terapéutico tal
10 como se describe más detalladamente más adelante.

Diagnóstico

Los anticuerpos reactivos con los polisacáridos des-N-acetilados pueden usarse para detectar polisacáridos capsulares (PS) de *N. meningitidis* o PS K1 de *E.coli* en muestras biológicas,
15 usando técnicas de Inmuno-diagnóstico. En este contexto, la invención proporciona la ventaja de que estos anticuerpos anti-PS des-N-acetilado, proporcionan la detección del polisacárido bacteriano en una muestra con un enlace reducido o no detectable al poli-ácido siálico derivado de un huésped, reduciendo de esta
20 manera la incidencia de resultados positivos falsos. Las técnicas de inmuno-diagnóstico adecuadas incluyen pero no se limitan necesariamente a, ensayos tales como competencia, reacción directa, o ensayos tipo emparejado. Esos ensayos incluyen Western blots; pruebas de aglutinación; inmuno-ensayos marcados y
25 mediados por enzimas, tales como ELISAs; ensayos tipo

biotina/avidina; radio-inmuno-ensayos; inmuno-electroforesis; inmuno-precipitación y similares. Las reacciones generalmente incluyen marcas reveladoras tales como marcas fluorescentes quimiluminiscentes, radioactivas, enzimáticas o moléculas de tinte, u
5 otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el polisacárido en la muestra y el o los anticuerpos que reaccionan con el mismo.

Los ensayos anteriormente mencionados generalmente incluyen la separación del anticuerpo no enlazado en una fase
10 líquida, de un soporte en fase sólida al cual se enlazan los complejos de polisacárido-anticuerpo. Los soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pozos de microtitulación); poli-cloruro de vinilo (por ejemplo, laminados o
15 pozos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); poli-fluoruro de vinilideno; papel diazotizado; membranas de nylon; perlas activadas; perlas de respuesta magnética, y similares.

Típicamente, primero se hace reaccionar un soporte sólido con
20 un componente en fase sólida (por ejemplo, un anticuerpo anti-PS) bajo condiciones de enlace adecuadas, de tal forma que el componente se inmovilice suficientemente sobre el soporte. Algunas veces, la inmovilización en el soporte puede mejorarse acoplando primero el anticuerpo a una proteína con mejores propiedades de
25 enlace, o que proporcione la inmovilización de los anticuerpos sobre

el soporte sin pérdida significativa de la actividad o especificidad de enlace de anticuerpos. Las proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas tales como albúminas de suero, incluyendo albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de limpete de orificio, moléculas de Inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, y otras proteínas bien conocidas para los expertos en la técnica. Otras moléculas que pueden usarse para enlazar los anticuerpos a soportes incluyen polisacáridos, poli-ácidos lácticos, poli-ácidos glicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y similares. Estas moléculas y métodos para acoplar estas moléculas a los antígenos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Brinkley, M. A. Bioconjugate Chem. (1992) 3: 2-13; Hashida y colaboradores., J. Appl. Biochem. (1984) 6: 56-63; y Anjaneyulu y Staros, International J. of Peptide and Protein Res. (1987) 30: 117-124.

Después de hacer reaccionar el soporte sólido con el componente en fase sólida, se retira del soporte cualquier componente en fase sólida no inmovilizado por medio de lavado, y el componente enlazado al soporte entonces se pone en contacto con una muestra biológica de la cual se sospeche que contiene fracciones de ligandos (por ejemplo PS, particularmente NmB PS o PS de *E.coli*), bajo condiciones de enlace adecuadas. Después de lavar para retirar cualquier ligando no enlazado, se agrega una fracción enlazadora secundaria bajo condiciones de enlace adecuadas, en donde el enlazador secundario puede asociarse

selectivamente con el ligando enlazado. Entonces se puede detectar el enlazador secundario usando técnicas bien conocidas en este campo.

Más particularmente, se puede emplear un método ELISA, en
5 donde los pozos de una placa de microtitulación se recubren con un anticuerpo anti-PS des-N-acetilado de acuerdo con la presente invención. Luego se agrega a los pozos recubiertos una muestra biológica que contenga o que se sospeche que contiene el polisacárido (particularmente NMB PS o PS K1 de *E. coli*). Después
10 de un periodo de incubación suficiente para permitir el enlace de anticuerpos, la placa puede lavarse para retirar las fracciones no enlazadas, y se agrega una molécula de enlace secundaria etiquetada de forma detectable. La molécula de enlace secundaria se deja reaccionar con cualquier antígeno capturado, la placa se
15 lava, y se detecta la presencia de una molécula de enlace secundaria usando los métodos bien conocidos en la técnica.

Así, en una modalidad particular, se detecta fácilmente la presencia del polisacárido enlazado de una muestra biológica, usando un enlazador secundario que comprenda un anticuerpo
20 dirigido contra los ligandos de anticuerpos. Un número de moléculas de Inmunoglobulina (Ig) anti-bovinos se conocen en la técnica, que pueden conjugarse a una marca enzimática detectable, tal como peroxidasa de radícula roja, fosfatasa alcalina, o ureasa, usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Entonces se
25 utiliza un sustrato enzimático apropiado para generar una señal

detectable. En otras modalidades relacionadas, se pueden practicar técnicas de ELISA de tipo competitivo, empleando los métodos conocidos por los expertos en este campo.

5 Los ensayos también pueden realizarse en solución, de tal forma que los anticuerpos y el polisacárido formen complejos bajo condiciones de precipitación. En una modalidad particular, el anticuerpo puede unirse a una partícula en fase sólida (por ejemplo, una perla de agarosa o similar), usando técnicas de acoplamiento conocidas en la materia, tales como por medio de acoplamiento químico directo o indirecto. La partícula recubierta con anticuerpos
10 entonces se pone en contacto bajo condiciones de enlace adecuadas con una muestra biológica de la cual se sospeche que contiene polisacárido, para proveer la formación de agregados de complejos de partícula-anticuerpo-PS que pueden precipitarse y separarse de la
15 muestra usando lavado y/o centrifugación. La mezcla de reacción puede analizarse para determinar la presencia o ausencia de complejos de anticuerpo-antígeno usando cualquier número de métodos convencionales, tales como los métodos de inmuno-diagnóstico descritos anteriormente.

20 Los reactivos de los ensayos antes descritos, incluyendo los anticuerpos generados por medio de la inmunización con el polisacárido des-N-acetilado de acuerdo con los métodos descritos en la presente, pueden proporcionarse en equipos con las instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de
25 realizar los inmunoensayos descritos antes. El equipo también puede

contener, dependiendo del inmunoensayo particularmente usado, marcas adecuadas y otros reactivos y materiales empacados (esto es, reguladores de lavado y similares). Los inmunoensayos convencionales, tales como aquéllos descritos anteriormente, pueden
5 conducirse usando esos equipos.

Inmunización pasiva y otras terapias basadas en anticuerpos

Además, los anticuerpos generados usando los métodos de la invención, son para tratar o prevenir enfermedades mediadas por *N. meningitidis* o por K1 de *E.coli*, en sujetos mamíferos.
10 Particularmente, los anticuerpos generados usando el polisacárido des-N-acetilado o sus conjugados de acuerdo con la invención, pueden proporcionarse en una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto, para proporcionar protección pasiva al sujeto contra la enfermedad por *N. meningitidis* o K1 de *E.*
15 *coli*, o para el tratamiento del cáncer.

Más particularmente, los anticuerpos Inmuno-protectores generados de acuerdo con los métodos descritos en la presente, y que reconocen los epítomos de polisacárido de *Neisseria* o K1 de *E. coli*, pueden administrarse a un sujeto (por ejemplo un paciente
20 humano) para inducir la inmunidad pasiva contra una enfermedad de *Neisseria*, ya sea para prevenir que se presente la infección o enfermedad, o como terapia para mejorar el resultado clínico en los pacientes con enfermedad establecida (por ejemplo, menor tasa de complicación tal como choque, menor tasa de mortalidad, o menor
25 patología, tal como sordera). Cuando los anticuerpos se administran

para efectuar una terapia contra el cáncer, los anticuerpos pueden opcionalmente tener unido un fármaco dirigido a las células cancerosas para matar el tumor o eliminarlo, por ejemplo una toxina (por ejemplo, ricina), radionúclido, y similares).

5 Los anticuerpos administrados a un organismo diferente de las especies en las que se reproducen. frecuentemente son inmunogénicos. Así, por ejemplo, los anticuerpos de murino o porcino administrados a un ser humano frecuentemente inducen una respuesta inmunológica contra el anticuerpo. Las propiedades
10 inmunogénicas del anticuerpo se reducen al alterar porciones o todo el anticuerpo en las secuencias característicamente humanas produciendo así anticuerpos quiméricos o humanos, respectivamente.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulina
15 que contienen una porción humana y una porción no humana. Más específicamente, la región que combina el antígeno (o región variable) de un anticuerpo quimérico humanizado se deriva de una fuente no humana (por ejemplo, murino), y la región constante del anticuerpo quimérico (que confiere una función de efector biológico a
20 la Inmunoglobulina) se deriva de una fuente humana. El anticuerpo quimérico preferentemente tiene la especificidad de enlace de antígeno de la molécula de anticuerpo no humana y la función de efectora conferida por la molécula de anticuerpo humana. Un gran número de métodos para generar anticuerpos quiméricos son bien
25 conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, las

Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,502,167, 5,500,362, 5,491,088, 5,482,856, 5,472,693, 5,354,847, 5,292,867, 5,231,026, 5,204,244, 5,202,238, 5,169,939, 5,081,235, 5,075,431 y 4,975,369). Un planteamiento alternativo es la
5 generación de anticuerpos humanizados mediante el enlace de las regiones CDR de los anticuerpos no humanos a las regiones constantes humanas mediante técnicas de ADN recombinante. Ver Queen y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, E.U.A. 86: 10029-10033 (1989), y la Publicación Internacional Número WO 90/07861.

10 En una modalidad preferida, se utiliza el vector de ADN recombinante para transfectar una línea celular que produzca un anticuerpo contra un péptido de la invención. El vector de ADN recombinante novedoso contiene un "gen de reemplazo" para reemplazar todo o una porción del gen que codifique la región
15 constante de Inmunoglobulina en una línea celular (por ejemplo, un gen de reemplazo puede codificar toda o una porción de una región constante de una inmunoglobulina humana, o una clase específica de inmunoglobulina), y una "secuencia objetiva" que permita la recombinación homologa dirigida con las secuencias de
20 inmunoglobulina dentro de la célula productora de anticuerpo.

En otra modalidad, se utiliza un vector de ADN recombinante para transfectar una línea celular que produzca un anticuerpo que tenga una función efectora deseada (por ejemplo, una región constante de una inmunoglobulina humana), en cuyo caso, el gen de
25 reemplazo contenido en el vector recombinante puede codificar toda

o a una porción de una región de un anticuerpo, y la secuencia
objetiva contenida en el vector recombinante permite la
recombinación homologa y la modificación genética dirigida dentro
de la célula productora de anticuerpo. En cualquier modalidad,
5 cuando solamente se reemplaza una porción de la región variable o
constante, el anticuerpo quimérico resultante puede definir el mismo
antígeno y/o la misma función efectora, y todavía se puede alterar o
mejorar, de tal forma que el anticuerpo quimérico pueda demostrar
una mayor especificidad antigénica, mayor constante de enlace de
10 afinidad, mayor función efectora, o mayor secreción y producción por
parte de la línea celular productora de anticuerpo transfectada, etc.

En otra modalidad, esta invención provee los anticuerpos
completamente humanos. Los anticuerpos humanos consisten
completamente en secuencias de polipéptidos característicamente
15 humanas. Los anticuerpos humanos de esta invención pueden
producirse por medio de una amplia variedad de métodos (ver, por
ejemplo, Larrick y colaboradores, Patente de los Estados Unidos de
Norteamérica Número 5,001,065). En una modalidad, los anticuerpos
humanos de la presente invención se producen inicialmente en
20 células trioma (descendientes de tres células, dos humanas y una de
ratón). Los genes que codifican a los anticuerpos entonces se clonan
y se expresan en otras células, particularmente células de mamífero
no humano. El planteamiento general para producir anticuerpos
humanos por medio de tecnología de trioma ha sido descrito por
25 Ostberg y colaboradores, (1983), *Hybridoma* 2: 361-367, Ostberg,

Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,634,664, y Engelman y colaboradores, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,634,666. Se ha encontrado que los triomas producen anticuerpos más establemente que los híbridomas ordinarios hechos de células humanas.

Los métodos para producir y formular anticuerpos adecuados para la administración a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo los anticuerpos pueden proporcionarse en una composición farmacéutica que contenga una cantidad efectiva de un anticuerpo y excipientes farmacéuticos (por ejemplo, solución salina). La composición farmacéutica puede opcionalmente incluir otros aditivos (por ejemplo, reguladores del pH, estabilizadores, conservadores, y similares). Una cantidad efectiva de anticuerpo es generalmente una cantidad efectiva para proporcionar protección contra enfermedades por *Neisseria*, o enfermedades por K1 de *E. coli*, o los síntomas, durante un periodo de tiempo deseado, por ejemplo un periodo de cuando menos aproximadamente 2 días a 10 días o 1 mes a 2 meses).

MÉTODOS PARA IDENTIFICAR EPÍTOPOS DE POLI-ACIDO

20 SIÁLICO

La invención también proporciona métodos para identificar un epítipo de poli-ácido siálico (PSA) enlazado por un anticuerpo. En general, estos métodos incluyen poner en contacto un derivado de polisacárido (también referido en la presente como derivado de poli-ácido siálico (PSA)) con un anticuerpo, bajo condiciones adecuadas

para la formación de complejos de antígeno-anticuerpo del anticuerpo y el derivado de polisacárido. El complejo de antígeno-anticuerpo entonces se pone en contacto con una enzima apropiada (por ejemplo una sialidasa, por ejemplo una endo- o exo-sialidasa, siendo de un interés particular el uso de neuraminidasa), para 5 facilitar el retiro de los residuos del derivado de poli-ácido siálico accesibles para la enzima neuraminidasa del complejo de antígeno-anticuerpo. Los residuos de derivado de poli-ácido siálico restantes en el complejo de antígeno-anticuerpo después del tratamiento con 10 la enzima sialidasa, definen de esta manera un epítipo enlazado por el anticuerpo. El complejo de antígeno-anticuerpo resultante puede someterse al análisis para determinar el epítipo enlazado por el anticuerpo. Ese análisis puede incluir la purificación del complejo de antígeno-anticuerpo, seguida por espectroscopia de masas (por 15 ejemplo, MALDI-TOF).

En algunas modalidades, el método incluye examinar una pluralidad de derivados de polisacárido (por ejemplo, una biblioteca de diferentes derivados de polisacárido), para facilitar la identificación de un derivado de polisacárido que tenga un epítipo 20 enlazado por medio de un anticuerpo de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo específico anti-PS, que reacciona mínimamente o de forma no detectable con el poli-ácido siálico del huésped.

EJEMPLOS

25 Se entenderá que los ejemplos y modalidades descritas en la

presente son para propósitos ilustrativos solamente y que varias modificaciones o cambios a la luz de los mismos se sugerirán para personas expertas en la técnica y van a incluirse dentro del espíritu y alcance de esta solicitud y de las reivindicaciones
5 adjuntas. Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente citadas en la presente se incorporan por consiguiente para referencia en su totalidad para todos los propósitos.

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE N-ACIL-NmB PS Y DERIVADOS.

Se preparó el N-acilo NmB PS (acilo = acetilo [Ac] o
10 propionilo [Pr]) mediante el método de Guo y Jennings, con las diferencias como se observan posteriormente (Guo, Z y Jennings, H. en 2001, N-Propionilation. En Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols. A J. Pollard, y C. J. Maiden, eds., Humana Press. Inc., Totowa, N.J. página 55) como sigue, para producir los
15 derivados de polisacárido de la presente invención. Se disolvieron ácido colomínico o NmB PS (231 miligramos; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) y 20 miligramos de borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich) en 10 mililitros de NaOH 2M y se calentaron a 100°C en un tubo sellado (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)
20 durante 6 horas.

Las condiciones de la reacción de des-N-acetilación difieren de aquéllas descritas por Guo y Jennings. En lugar de producir un derivado de polisacárido completamente des-N-acetilado como es descrito por Guo y Jennings, el producto contiene normalmente el
25 20 por ciento de residuos de N-acetilo como se determina mediante

el ensayo de resorcinol descrito posteriormente. La Figura 1 proporciona la estructura de un polisacárido des-N-acetilado de ejemplo. El planteamiento descrito en la presente tiene ventajas para la preparación de derivados de polisacárido que contienen una mezcla de residuos de N-acetilo y N-acilo (por ejemplo, N-propionilo, N-butanilo, etc.), así como para preparar derivados de polisacárido que contienen una mezcla de residuos N-acetilados y des-N-acetilados, ya que asegura que un mínimo del 20 por ciento de los residuos sean N-acetilados. También, la adición de borohidruro de sodio reduce la cetona en el extremo de reducción del polisacárido hasta un alcohol y también una imina que podría formarse entre el grupo amino des-N-acetilado y la cetona de C2 del residuo del extremo de reducción hasta una amina secundaria. Los derivados de NmB PS que contenían residuos con grupos N-acetilo, sitios des-N-acetilo, y una amina secundaria cíclica en el residuo del extremo de reducción, se enlazaron mediante los anticuerpos monoclonales anti-NmB PS, no auto-reactivos (anticuerpos monoclonales "SEAM", Figura 2) (véase el Ejemplo 3 posteriormente) y, por lo tanto, son importantes antígenos para producir anticuerpos capsulares anti-NmB no auto-reactivos protectores.

Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, la solución se ajustó a pH de 8.0 con HCl 2M, se dializó contra agua, y se liofilizó. El polisacárido se volvió a suspender en 2 mililitros de 0.1 X PBS (KH_2PO_4 0.1 mM, Na_2HPO_4 1 mM, NaCl 13.7 mM, KCl

0.27 mM, pH de 7.0), se centrifugó (5000 x g) durante 10 minutos, para remover el material precipitado. En contraste con los métodos de Guo y Jennings, el polisacárido resuspendido se cargó en una columna de 1.5 centímetros x 25 centímetros de Toyoperl HW-55F (Supelco, Bellefonte, PA) equilibrada con 0.1X PBS. Las fracciones que se eluyeron con una masa aparente mayor de 10 kDa se combinaron y se liofilizaron. La columna HW-55F se calibró utilizando dextrano azul, albúmina de suero de bovino, ovalbúmina, anhidrasa carbónica, y el derivado trinitrofenílico de dihidrazida del ácido aspártico como estándares (Sigma-Aldrich).

Se acilaron los grupos amino libres al volver a suspender el polisacárido (aproximadamente 100 miligramos) en 5 mililitros de NaOH 0.1 M, y agregando 0.2 mililitros de anhídrido de acilo (por ejemplo, anhídrido del ácido acético o anhídrido del ácido propiónico) en 5 alícuotas con agitación durante varias horas. (No se incluyó el anhídrido acético en los derivados previamente preparados por Guo y Jennings). El pH de la solución se mantuvo a aproximadamente 8-9 agregando NaOH 2 M como fuera requerido. El pH de la solución se elevó a aproximadamente 12 durante 1 hora para remover los grupos O-acilo, luego se disminuyó a un pH de 8 utilizando HCl 2M, la solución se dializó, se liofilizó, y el producto se purificó y se liofilizó como se describe anteriormente.

Aunque la mayoría de los grupos amino se acilaron en este procedimiento (≥ 90 por ciento), algunos grupos amino no se derivaron y siguieron siendo grupos amino libres. La eficiencia de

la acilación depende de la solubilidad del anhídrido de ácido en agua. Por lo tanto, la acilación con anhídrido proplónico, el cual es menos soluble en agua que el anhídrido acético, dará como resultado una cantidad mayor de grupos amino libres que el
5 anhídrido acético. Los residuos que contenían el polisacárido con los sitios N-acetilo se enlazaron mediante los anticuerpos monoclonales SEAM (véase el Ejemplo 3, posteriormente) y es por lo tanto, un determinante importante para producir anticuerpos capsulares anti-NmB no auto-reactivos, protectores,

10 Se produjeron fragmentos más pequeños del polisacárido (grado promedio de polimerización [Dp] 30) mediante tratamiento con ácido. Una porción del N-acilo NmB PS (20 miligramos) se disolvió en 5 mililitros de NaOAc 0.2 M, pH de 5.1, y se calentó a 70°C en un tubo sellado durante 30 minutos. La solución se
15 dializó, liofilizó, purificó y liofilizó de nuevo como se describe anteriormente.

Además de producir el polisacárido que tiene un Dp que es en promedio más pequeño que aquél del polisacárido de partida, el tratamiento con ácido da como resultado la formación de lactonas
20 entre el grupo carboxilo de C1 y el grupo OH de C9 del residuo anterior (Figura 3). Se puede presentar polisacárido que contenga cantidades pequeñas de lactona en la cápsula bacteriana NmB, pero es improbable que ocurra esto en el poli-ácido slálico humano. La presencia de pequeñas cantidades de lactona en NmB
25 PS puede ser importante para producir anticuerpos capsulares

anti-NmB no auto-reactivos, protectores.

Se introdujeron grupos aldehído en los extremos no reductor y reductor del polisacárido para utilizarse en unión covalente con una proteína portadora. El polisacárido (20 miligramos) se disolvió en 1 mililitro de regulador de NaOAc 0.1 M, pH de 6.5. Se agregó *meta*-periyodato de sodio (5 miligramos, Sigma-Aldrich), y la solución se mantuvo en la oscuridad durante 30 minutos. Se degradó el NaIO_4 restante agregando 0.1 mililitros de etilenglicol al 10 por ciento (peso/volumen) en agua, y se dejó durante 30 minutos. Este procedimiento produce grupos aldehído en C8 y/o C7 del residuo terminal del extremo no reductor y, para el polisacárido que contiene un residuo terminal del extremo reductor en el cual la cetona de C2 se redujo hasta un alcohol durante la desacetilación (véase anteriormente), un grupo aldehído en C6 (Figura 4).

15 **Preparación de dodecilamina y conjugados de proteína-derivado de PS.**

Se prepararon derivados de dodecilamina al combinar 20 miligramos del derivado de NmB PS que contenía aldehídos o cetonas del extremo no reductor o del extremo reductor, con 10 miligramos de dodecilamina en 5 mililitros de agua. Después de calentar la mezcla a aproximadamente 50 grados C durante 30 minutos con agitación, se agregaron 5 miligramos de clano-borohidruro de sodio. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, y luego se dializó en agua durante 3 a 5 días para remover el exceso de dodecilamina.

La reactividad de los derivados de dodecilamina con los anticuerpos monoclonales SEAM se determinó mediante ELISA de enlace directo en donde el antígeno (es decir, el derivado de polisacárido de dodecilamina) se absorbió a la superficie de una placa microtituladora incubando una solución del antígeno en regulador de PBS en el pozo de una placa microtituladora durante la noche a 4 grados C. Se lavaron las placas con el regulador de PBS (5 veces) y se bloquearon con el regulador de PBS que contenía el 1 por ciento (peso/peso) de albúmina de suero de bovino (Sigma; regulador de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos se diluyeron en el regulador de bloqueo y se agregaron a la placa (100 microlitros por pozo). Después de incubar la placa durante 4 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron con regulador de PBS (5 veces), y se agregó el anticuerpo de conejo anti-conjugado de fosfatasa alcalina de ratón (Zymed) diluido en el regulador de bloqueo. Después de incubar una hora adicional, las placas se lavaron (5 veces) con regulador de PBS y el anticuerpo enlazado se detectó agregando sustrato de fosfato de p-nitrofenilo en regulador de carbonato de sodio 50 mM, pH de 9, conteniendo $MgCl_2$ 1 mM. Se midió la absorbencia a 405 nanómetros después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, utilizando un lector de placas microtituladoras Modelo BioRad. Los resultados de experimentos de enlace se muestran en la Figura 38.

Se prepararon derivados de polisacárido conjugados a una

proteína portadora, mediante la combinación de 10 miligramos de albúmina de suero de bovino (BSA, Pierce, Chemical, Co.) con 20 miligramos de derivado de polisacárido conteniendo un grupo aldehído del extremo no reductor en regulador de PBS. Se
5 agregaron 5 miligramos de cianoborohidruro de sodio, y la mezcla se agitó en la oscuridad durante 5 días. La solución se dializó (membrana de corte de 10-14 kDa) en regulador de PBS. La reactividad de los conjugados de BSA-derivado de PS con los anticuerpos monoclonales se determinó mediante ELISA de enlace
10 directo como se describe en el párrafo previo. Los resultados de experimentos de enlace se muestran en la Figura 39.

La concentración de ácido siálico y ácido des-N-acetil-siálico en las soluciones de suministro derivadas de NmB PS se determinó mediante la reacción de resorcinol de Svennerholm (Svennerholm,
15 L. (1957) Blochim. Biophys. Acta 24: 604) modificada como sigue. El reactivo de procesamiento de resorcinol se preparó al combinar 9.75 mililitros de agua, 0.25 mililitros de $\text{CuSO}_4 \cdot 0.1\text{M} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mililitros de solución de 20 miligramos por mililitro de resorcinol en agua, y 80 mililitros de HCl concentrado. El reactivo de
20 procesamiento de resorcinol (300 microlitros) se combinó con el ácido siálico o con la solución de muestra de ácido des-N-acetil-siálico (hasta 50 microgramos de ácido siálico) o solución de suministro estándar en agua (300 microlitros) en una placa microtituladora de pozo profundo de polipropileno (2 mililitros). La
25 placa se selló con una cubierta de placa y se calentó en un baño

de agua en ebullición durante 30 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agregó alcohol isoamílico (600 microlitros) y se mezcló utilizando una pipeta. Las fases se permitieron separar y la capa de alcohol isoamílico superior se
5 removi6 hacia una placa microtituladora limpia. 250 microlitros del extracto de alcohol isoamílico y la soluci6n acuosa inferior se transfirieron de modo separado a una placa microtituladora de poliestireno y se midi6 la absorbencia a 495 nan6metros y a 580 nan6metros.

10 La cantidad de 6cido N-acetil-si6lico se determin6 a partir de la absorbencia de la fracci6n de alcohol isoamílico a 580 nan6metros, y la cantidad de 6cido N-acetil-si6lico se determin6 a partir de la absorbencia de la fracci6n acuosa a 495 nan6metros en comparaci6n con una curva est6ndar para cada uno. La
15 cantidad del 6cido des-N-acetil-si6lico se corrigi6 para la cantidad de des-N-acetilaci6n que ocurre durante el paso de hidr6lisis 6cida del ensayo al medir la cantidad de des-N-acetilaci6n que ocurre en el est6ndar de 6cido si6lico.

Purificaci6n de HPLC en Fase Inversa de derivados de
20 **NmB PS que contienen grupos alquilo de cadena larga.**

Los derivados de NmB PS que contienen grupos alquilo de cadena larga (es decir, $\geq C8$) (por ejemplo, derivados de dodecilamina) se separaron mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna Poros R1/H y la Estaci6n de Trabajo de
25 Cromatografía de Perfusi6n BioCAD. Los derivados se eluyeron

con un gradiente desde el 0 por ciento hasta el 80 por ciento de acetonitrilo en regulador de acetato de amonio 20 mM, pH de 6.5 durante 30 minutos, a una velocidad de flujo de 5 mililitros por minuto. Las fracciones (1 mililitro cada uno) se recolectaron.

5 Las fracciones que contenían derivados que eran reactivas con los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, SEAM 3, SEAM 12, Granoff y colaboradores, 1998, *supra*) se determinaron agregando 100 microlitros de cada fracción a un pozo de una placa microtituladora de 96 pozos (Immulon II, Dynatech) e incubando la
10 placa a 4 grados C durante la noche. Las placas se lavaron con regulador de PBS (5 veces) y se bloquearon con regulador de PBS conteniendo 1 por ciento (peso/peso) de albúmina de suero de bovino (Sigma; regulador de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos se diluyeron en regulador de bloqueo y
15 se agregaron a la placa (100 microlitros por pozo). Después de incubar la placa durante 4 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron con regulador de PBS (5 veces), y se agregó el anticuerpo de conejo anti-conjugado de fosfatasa alcalina de ratón (Zymed) diluido en regulador de bloqueo. Después de incubar una
20 hora adicional, las placas se lavaron (5 veces) con regulador de PBS y se detectó el anticuerpo de enlace agregando sustrato de fosfato de p-nitrofenilo en regulador de carbonato de sodio 50 mM, pH de 9, conteniendo $MgCl_2$ 1 mM. Se midió la absorbencia a 405 nanómetros después de 30 minutos de incubación a temperatura
25 ambiente utilizando un lector de placas microtituladoras Modelo

BioRad.

Espectroscopia de masas MALDI-TOF de derivados de dodecilamina del extremo no reductor de NmB PS. El solvente en fracciones obtenidas de la HPLC de fase inversa se evaporó
5 utilizando un SpinVac (ThermoSavant). El residuo se disolvió en acetonitrilo/agua (1:1). Una matriz de trihidroxi-acetofenona (THAP) en una concentración de 3 miligramos por mililitro en acetonitrilo/agua se aplicó sobre el objetivo (0.5 microlitros por mancha). Después de secar las manchas de matriz al vacío, la
10 muestra se aplicó en la parte superior de la mancha de matriz (0.5 microlitros). Se realizó MALDI-TOF (Autoflex, Bruker Daltonics) tanto en el modos lineal positivo como negativo (30 disparos de láser de N₂, 50 por ciento de potencia láser) y en el modo positivo y negativo del reflector (30 disparos de láser de N₂, 50 por ciento
15 de potencia láser). Los espectros de masas se calibraron utilizando los estándares de péptido externo (Bruker Daltonics) y ácido siálico (EY Scientific). El error de las masas observadas se estimó en ≤ 0.1 por ciento. Las figuras 20-22 muestran estructuras identificadas por MALDI-TOF de una preparación de NmB PS que
20 fueron reactivas con el anticuerpo monoclonal SEAM 3 capsular anti-NmB no auto-reactivo, protector, y se purificaron mediante HPLC de fase inversa como se describe anteriormente. Los derivados contienen una mezcla de residuos de des-N-acetilo, N-acetilo, y N-propionilo con al menos un residuo de des-N-acetilo.

25 EJEMPLO 2: INHIBICIÓN DEL ENLACE DE ANTICUERPOS

**MONOCLONALES CAPSULARES DE NmB NO AUTO-
REACTIVOS AL N-PR NmB PS EN ELISA POR
INTERMEDIARIOS EN LA SÍNTESIS DE N-ACILO NmB PS.**

Las vacunas conjugadas de polisacárido-proteína
5 preparadas de NmB PS en donde los grupos N-acetilo de NmB
PS han sido reemplazados con grupos propionilo (N-Pr NmB PS)
producen anticuerpos bactericidas de suero en ratones
(patentes citadas) y en primates no humanos (Fusco), y un
subconjunto de estos anticuerpos tienen auto-reactividad
10 mínima (patentes citadas). Se desconocen las razones por las
cuales los anticuerpos N-Pr NmB PS que no reaccionan con el
polisacárido humano fueron bactericidas contra las cepas NmB.
En este ejemplo, se muestra que los intermediarios en la
síntesis de N-acilo NmB PS inhiben el enlace de los anticuerpos
15 monoclonales capsulares anti-NmB no auto-reactivos en ELISA.
Se llevó a cabo el ELISA en fase sólida como sigue.

Las placas de microtitulación (Immulon 2; Dynatech
Laboratories, Inc.) conteniendo 100 microlitros/pozo de avidina
(4 microgramos/mililitro; ExtrAvidin; Sigma-Aldrich) en suero
20 regulado con fosfato (PBS; pH de 7.4), se incubaron durante la
noche a 4°C. Después de lavar tres veces con PBS, se
agregaron a cada pozo 100 microlitros de N-Pr MenB PS
biotinilado diluido a 1:800 en PBS, y se incubaron a 37°C
durante 2 horas. Las placas entonces se lavaron tres veces con
25 PBS y los pozos sellenaron con 250 microlitros de regulador de
bloqueo (PBS conteniendo albúmina de suero bovino al 1 por

ciento [BSA] y azida de sodio al 0.1 por ciento; [pH de 7.4]) y luego se incubaron durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente en los sitios de enlace no específicos de bloqueo. Las placas se lavaron tres veces con regulador lavado (PBS - Tween 20 al 0.1 por ciento - azida de sodio al 0.1 por ciento; [pH de 7.40]). Los anticuerpos monoclonales capsulares anti-NmB no auto-reactivos se diluyeron previamente a concentraciones para dar una OD de 0.5 a 1.0 después de aproximadamente 30 minutos de incubación con el sustrato. Los anticuerpos monoclonales se agregaron a pozos de placas de réplica, cada uno conteniendo una concentración de inhibición final de 100 microgramos/mililitro N-Pr NmB PS de alto peso molecular, o derivado de polisacárido, o regulador solo. Las placas se cubrieron e incubaron durante la noche a 4 grados C. Al día siguiente, los pozos se lavaron cinco veces con regulador lavado y se incubaron durante 3 horas a 4°C con 100 microlitros/pozo de anticuerpo policlonal anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (IgA + IgG + IgM; Zymed) diluido a 1:2000 en regulador de dilución. Las placas entonces se lavaron con regulador de lavado, y se agregaron a cada pozo 100 microlitros de sustrato preparado recientemente (fosfato de p-nitrofenilo; Sigma) diluido a 1 miligramo/mililitro en regulador de sustrato (dietanolamina 1.0 M, MgCl₂ 0.5 mM [pH de 9.8]). Los valores de absorbencia a 405 nanómetros se midieron en aproximadamente 30 minutos. Se calculó el porcentaje de inhibición comparando los valores de absorbencia a 405

nanómetros después de 30 minutos de incubación con sustrato en los pozos que contenían el inhibidor y los pozos correspondientes sin inhibidor.

Los siguientes derivados de NmB PS se probaron para
5 determinar la actividad inhibidora: NmB PS desacetilado (de Ac NmB PS), N-acetilo NmB PS resintetizado (N-Ac NmB PS), N-propionilo NmB PS (N-Pr NmB PS), N-Ac NmB PS oxidado con peryodato, y N-Pr NmB PS (Ox N-Ac NmB PS y Ox N-Pr NmB PS, respectivamente), y los derivados de NmB PS que se
10 trataron con ácido para disminuir el Dp promedio (H⁺N-Ac NmB PS, H⁺Ox N-Ac NmB PS, H⁺N-Pr NmB PS, H⁺Ox N-Pr NmB PS). Además, como los controles negativos, también se probaron el NmB PS aislado de la cepa MC58 del Grupo B de *N. meningitidis*, y el ácido colomínico aislado de K1 de *E. coli*
15 (Sigma-Aldrich). NmB PS se aisló como es descrito por Constantino y colaboradores. (1999 Vaccine 17: 1251). Para eliminar la posibilidad de que se presentara el NmB PS N-acetilado resultante de la hidrólisis durante el aislamiento, el NmB PS de *N. meningitidis* se trató con un exceso de anhídrido acético en NaOH 0.1 M como se describe en lo anterior, y se
20 incubó durante 1 hora a pH de 11 después de la acetilación para remover los grupos O-acetilo.

Como se muestra en la Figura 5, N-Pr NmB PS fue el mejor inhibidor de los cuatro anticuerpos monoclonales SEAM,
25 mientras que el ácido colomínico o NmB PS no inhibieron el enlace de cualquiera de los anticuerpos monoclonales. En los

experimentos de control, la misma solución del ácido colomínico o NmB PS inhibió completamente el enlace del anticuerpo 2-1-B anti-NmB PS (clase IgM, (Mandrell y colaboradores. 1982 J. Immunol. 129: 2172) a N-Ac NmB PS o N-Pr NmB PS en el ELISA a concentraciones de inhibidor menores de 0.1 microgramos/mililitro. Se esperaban estos resultados ya que los anticuerpos monoclonales SEAM se seleccionaron por su capacidad para enlazarse a N-Pr NmB PS en el ELISA, debido a que el enlace es inhibido por el N-Pr NmB PS soluble, pero no el enlace a NmB PS (como un derivado de dihidrazida adípico) como el antígeno superficial en el ELISA. Sin embargo, el ácido colomínico sí llega a ser un inhibidor de SEAM 3 y SEAM 18 después de la desacetilación simple, y de SEAM 12 después de la re-acetilación. En contraste, el tratamiento con ácido, que puede dar como resultado la formación de lactona (Figura 3), y la oxidación de los derivados de N-Ac y N-Pr (Figura 4) da como resultado inhibidores más pobres que los polisacáridos no modificados correspondientes. Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales reconocen un epítipo que, al menos en parte, contiene un residuo des-N-acilado. Además, ya que las concentraciones inhibitoras para todos los derivados se incrementan después de la oxidación, es probable que el epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales está en los extremos de no reducción y/o reducción del polisacárido, los cuales se modificaron mediante el tratamiento con peryodato (Figura 4).

**EJEMPLO 3: INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD
BACTERICIDA MEDIADA POR EL COMPLEMENTO DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-N-PR NmB PS MEDIDA
CONTRA LA CEPA 8047 DE NmB.**

5 Este ejemplo demuestra que la actividad bactericida de los anticuerpos SEAM puede bloquearse mediante los derivados de polisacárido que contienen los residuos de des-N-acetilo y, de este modo demuestra que los residuos de des-N-acetilo están presentes en el polisacárido capsular de la bacteria NmB viva, y
10 el objetivo antigénico de los anticuerpos protectores.

 La actividad bactericida mediada por el complemento se midió con la cepa 8047 del Grupo B de *N. meningitidis* como sigue. Después de crecer durante la noche en ágar de chocolate, varias colonias de *N. meningitidis* se inocularon en
15 el caldo Mueller-Hinton (inicio A_{620nm} de aproximadamente 0.1), y el organismo de prueba se cultivó durante aproximadamente 2 horas a un A_{620nm} de aproximadamente 0.6. Después de lavar la bacteria dos veces en regulador de Gey que contiene albúmina de suero bovino al 1 por ciento (BSA; grado RIA, Sigma-
20 Aldrich), aproximadamente se agregaron de 300 a 400 CFU a la mezcla de reacción. El ensayo se realizó con el complemento de conejo (suero de conejo bebé combinado obtenido en Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá). La mezcla de reacción final de 40 microlitros contuvo el 20 por ciento de anticuerpos
25 monoclonales de complemento (volumen/volumen), diluidos en regulador de BSA al 1 por ciento de Gey con o sin inhibidor.

CFU/ml en las mezclas de reacción se determinaron después de un cultivo durante la noche en ágar de chocolate (Remel, Rancho Cordova, CA). Las titulaciones o concentraciones bactericidas se definieron como la dilución en suero (o
5 concentración de anticuerpo) que da como resultado una reducción del 50 por ciento en las unidades de formación de colonias (CFU) por mililitro después de 60 minutos de incubación de la bacteria en la mezcla de reacción, comparándose con las CFU por mililitro de control en el tiempo
10 0. Típicamente, la bacteria incubada con el anticuerpo y complemento de control negativo mostró un aumento del 150 al 200 por ciento en las CFU/mililitro durante los 60 minutos de incubación.

Como se describe en el Ejemplo 2, el enlace del
15 anticuerpo monoclonal SEAM 3 anti-N-Pr NmB PS con el N-Pr NmB PS en fase sólida en un ELISA, se inhibió mediante el ácido des-acetil-colomínico soluble o re-N-acetilo NmB PS. La Figura 6 muestra la capacidad de estos intermediarios para inhibir la actividad bactericida de todos los anticuerpos
20 monoclonales anti-N-Pr NmB PS, como se midió contra la cepa 8047 del Grupo B de *N. meningitidis*. La Figura 7 muestra los datos de inhibición para SEAM 3. El NmB PS re-N-acetilado fue casi tan bueno como un inhibidor de la actividad bactericida del SEAM 3 como el N-Pr NmB PS (0.6 microgramos/mililitro,
25 comparándose con 0.2 microgramos/mililitro), mientras que se requirieron concentraciones elevadas 7-veces de des-N-Ac NmB

PS para la inhibición, y concentraciones elevadas >20-veces de NmB PS. De este modo, el epítipo capsular reconocido por el SEAM 3, un anticuerpo monoclonal anti-N-Pr NmB PS bactericida no auto-reactivo, se presentó en los Intermediarios producidos durante las síntesis del derivado de N-Pr NmB PS que no contiene un grupo propionilo. Únicamente el NmB PS nativo inhibió la actividad bactericida del anticuerpo monoclonal anti-NmB PS, 2-1-B, y únicamente el N-Pr NmB PS inhibió la actividad bactericida de SEAM 2 (Figura 6). Como un control adicional para la especificidad, 50 microgramos/mlilitro de polisacárido capsular meningocócico A no inhibieron la actividad bactericida de cualquiera de los anticuerpos monoclonales probados.

EJEMPLO 4: DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE DERIVADOS DE NmB PS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CAPSULARES ANTI-NMB NO AUTO-REACTIVOS, PROTECTORES, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE MASAS MALDI-TOF

Los anticuerpos monoclonales capsulares anti-NmB no auto-reactivos protectores, (Figura 2) se enlazaron a perlas magnéticas como sigue. Las perlas de IgG de cabra anti-ratón MagnaBind^{MR} (200 microlitros; Pierce) se combinaron con 5 microgramos of SEAM 2, SEAM 3, SEAM 12, o SEAM 18 en regulador PBS. La mezcla se incubó a temperatura ambiente en una rueda de rotación durante 1 hora. Las perlas se lavaron 3 veces con regulador de lavado (véase Ejemplo 2, anterior). El

anticuerpo enlazado se reticuló a las perlas agregando BS3^{MR} (Pierce). a una concentración de 2 mM en regulador PBS y mezclando por vórtex durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lo que no reaccionó se degradó agregando Tris a 0.1 M, pH de 8.0 durante 10 minutos. Las perlas se lavaron 3 veces con regulador de PBS. Se agregó N-Pr NmB PS (240 microgramos) preparado en el Ejemplo 1, a las perlas lavadas en regulador de PBS. Después de incubar la mezcla en una rueda giratoria durante 1 hora a temperatura ambiente, el material no enlazado se eliminó y las perlas se lavaron 2 veces con regulador de lavado y una vez con regulador de PBS, y luego se resuspendieron en 200 microlitros de regulador de PBS. Se agregó neuraminidasa (0.00175 U, EC3.2.1.18; Sigma) a cada tubo y la mezcla se incubó durante la noche a 37 grados C en una rueda giratoria. El polisacárido enlazado es heterogéneo con respecto al Dp, y por consiguiente, se trató el complejo de perla-anticuerpo- polisacárido con neuraminidasa, la cual remueve en secuencia los residuos del extremo no reductor del polímero, para reducir el tamaño del polímero hasta la longitud que pueda protegerse de la digestión adicional por el anticuerpo. Después del tratamiento con neuraminidasa, las perlas se lavaron 3 veces con regulador de carbonato de aluminio 50 mM, pH de 8.5, y el polisacárido enlazado se eluyó finalmente con trietil-amina 0.1 M en agua.

Para el análisis mediante espectroscopia de masas con el tiempo de ionización de desabsorción de láser asistido por

matriz de vuelo (MALDI-TOF), la solución de polisacárido eluido y trietilamina/agua se eliminó por evaporación en un Spin-Vac (Savant). La muestra seca se resuspendió en 4 microlitros de acetonitrilo/agua al 50 por ciento (volumen/volumen). La matriz, una solución saturada de 2',4',6'-trihidroxi-acetofenona (THAP, Fluka Chemical) en acetonitrilo/agua al 50 por ciento (0.5 microlitros), se aplicó en una placa objetiva de acero inoxidable. La muestra de polisacárido se aplicó (2 veces, 0.5 microlitros) en la parte superior del punto de THAP seco. Las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro de masas Bruker Autoflex MALDI-TOF operando en un modo de reflector de ion negativo.

La Figura 8 muestra un espectro de masas representativo de los derivados de polisacárido enlazados por SEAM 3 después del tratamiento con neuraminidasa. La Figura 9 muestra las masas observadas para cada muestra y las masas teóricas de los iones correspondientes que son consistentes con las masas observadas. Las estructuras de los derivados de polisacárido se muestran en las Figuras 10 a 19. Todas las masas corresponden a un disacárido que contiene uno o más residuos en los cuales se ha eliminado el grupo N-acetilo en el grupo amino C-5. También, los disacáridos que contienen un residuo des-N-acetilado, contienen un grupo N-acetilo en el segundo residuo de ácido siálico pero no un grupo N-propionilo. Además, ya que la exosialidasa elimina los residuos procesivamente desde el extremo no reductor, todos los

derivados enlazados por los anticuerpos monoclonales SEAM y detectados por MALDI-TOF son derivados del extremo reductor. Esto no precluye la posibilidad de que también se puedan presentar derivados N-acetilados en los residuos del extremo no reductor o interior del polisacárido, debido a que sería difícil detectar tales derivados porque el polisacárido es heterogéneo con respecto al Dp.

En resumen, los resultados del ELISA de inhibición para los intermediarios en la síntesis de N-Pr NmB PS y los derivados de N-Pr NmB PS capturados por los anticuerpos monoclonales SEAM, e identificados por espectroscopía de masas MALDI-TOF, muestran que el determinante mínimo reconocido por los anticuerpos monoclonales capsulares del Grupo B anti-NmB, bactericidas, no auto-reactivos, es un disacárido que contiene uno o dos residuos de N-acetilados.

EJEMPLO 5: PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE PS N-ACETILADOS UTILIZANDO SUSPENSIÓN DE SOLVENTE ORGÁNICO/AGUA DE PS Y AGENTE ACILANTE.

Preparación de los derivados de NmB PS con grupos amino C5 protegidos como tricloroacetil- (o trifluoroacetil-) amidas.

20 miligramos de ácido N-acetil-colomínico se disolvieron en 4 mililitros de formamida desionizada con resina AG 501-8X de lecho mezclado (BioRad) y conteniendo el 2.5 por ciento (volumen/volumen) de agua. Se agregó una cantidad de metóxido de sodio en metanol igual a la cantidad 1.1 molar de

grupos amino libres, seguida por una mezcla (1.2 equivalentes molares en total) de anhídrido tricloro-acético (o etil-trifluoroacetil-éster) y anhídrido acético (u otro grupo acilo activado, por ejemplo, anhídrido propiónico, N-
5 hidroxysuccinimida-éster láurico, y similares) donde la cantidad del reactivo de trihaloacilación es igual a la fracción de los grupos N-acetilo deseados en el producto final (por ejemplo, 10 por ciento, 25 por ciento, 50 por ciento, etc.). La mezcla se agitó durante varios minutos y el pH se ajustó a 8 (determinado
10 sometiendo a manchado la mezcla en un papel de pH) agregando hidróxido o metóxido de sodio adicional como fuera necesario. La mezcla de reacción se dializó en agua y se liofilizó. Los productos pueden purificarse por exclusión de tamaños (véase, e.g., Ejemplo 1) y/o cromatografía de
15 intercambio iónico de acuerdo a los métodos bien conocidos en la técnica. Si se deseaba, los grupos tricloroacetilo (o trifluoroacetilo) se eliminaron agregando borohidruro de sodio (o un carbonato de amonio a una concentración de 0.1 M, pH de 9 para las amidas protegidas por trifluoroacetilo) y agitando a
20 temperatura ambiente durante 1 hora antes de la diálisis en agua y liofilización.

Preparación de derivados NmB PS reacilados que contienen un aldehído del extremo no reductor.

Se agregó *meta*-periyodato de sodio (1 miligramo de
25 periyodato por 10 miligramos de polisacárido) a una solución de NmB PS re-N-acilado, en donde todos de los grupos amino

estaban en la forma de trifluoroacetilo (obtenido como se describe en el Ejemplo 8) o tricloroacetilo (preparado como se describe en lo anterior en el Ejemplo 5) protegido u otra amida en regulador de acetato de sodio 0.1M, pH de 6.5. La reacción se llevó a cabo en la oscuridad durante un periodo de 30 minutos a 1 hora, y se extinguió mediante la adición de un exceso de etilenglicol en agua. La mezcla de reacción se dializó entonces en agua y se liofilizó.

Los productos se conjugaron luego con una proteína portadora (BSA) mediante aminación reductiva con cianoborohidruro de sodio. El derivado de polisacárido que contiene un grupo aldehído en el extremo no reductor, se combinó con la proteína portadora en una relación de 2:1 en regulador de PBS. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 miligramo por miligramo de proteína portadora) y la mezcla se agitó en la oscuridad durante 5 días, y luego se dializó en regulador de PBS (membrana de corte a 10-14 kDa).

EJEMPLO 8: INCORPORACIÓN BIOSINTÉTICA DE RESIDUOS DE ÁCIDO SIÁLICO PROTEGIDOS POR N-TRICLOROACETILO (O TRIFLUOROACETILO) DENTRO DE NMB PS Y USO DEL PS CAPSULAR RESULTANTE PARA PREPARAR VACUNAS CONJUGADAS DE PS-PROTEÍNA.

Se disolvieron 0.5 milimoles (108 miligramos) de clorhidrato de manosamina en 10 mililitros de metanol conteniendo 0.55 milimoles de metóxido de sodio, y se enfriaron a 4 grados C. Se agregaron 0.6 milimoles de anhídrido

tricloroacético (o trifluoroacetato de etilo) y la mezcla se agitó durante 2 horas. El progreso de la reacción se monitoreó aplicando la mezcla de reacción sobre una placa de TLC de gel de sílice, revelando la placa con acetato de etilo, metanol, agua (5:2:1), y detectando la desaparición de la manosamina en el origen con vapor de yodo. Al término de la reacción, se agregaron 1.5 milliequivalentes de resina de lecho mixto AG 501-8X (BioRad) y 10 mililitros de agua, el pH se ajustó a 7 agregando NaOH o HCl como se necesitó y la mezcla se agitó suavemente durante 1 hora. La mezcla de solvente y las perlas se separaron, y el solvente se eliminó mediante liofilización. Se realizó una purificación adicional del producto, de ser necesario, mediante cromatografía en gel de sílice utilizando el mismo sistema de solvente descrito para la TLC. El solvente de las fracciones combinadas que contenían el material deseado se eliminó por evaporación. Finalmente, el producto seco se resuspendió en agua y se liofilizó.

La manosamina trihaloacetilada se incorporó dentro de NmB PS mediante la inoculación de colonias de la cepa My de NmB cultivadas durante la noche a 37 grados C en dióxido de carbono al 5 por ciento sobre una placa de ágar de chocolate recientemente veteada a un OD_{620nm} de 0.1 en caldo Muller-Hinton complementado con 5 millimolar de N-acil-manosamina, por ejemplo, N-acetil-, tricloroacetil-, trifluoroacetil-manosamina. La cepa M7 contiene un transposón que interrumpe el gen que codifica la N-acetil-D-glucosamina-6-

fosfato-2-epimerasa (J. Swartley, J. S. y Stephens, D.S., 1994, J. Bact. 176: 1530; Swartley, J. S., Ahn, J. H., Liu, L-J, Kahler, C. M., y Stephens, D. S., 1996, J. Bact. 178: 4052). Como resultado, la bacteria no puede sintetizar el polisacárido de
5 cápsula a menos que el medio de crecimiento sea complementado con N-acetil-manosamina. Por lo tanto, el contenido de N-acilo del polisacárido de cápsula sintetizado en este sistema puede ser determinado por el N-acilo o la mezcla de N-acil-manosamina proporcionada en el medio de
10 crecimiento. La bacteria se cultivó a 37 grados C a un OD_{620nm} durante la noche).

La producción de polisacárido de cápsula que contiene los grupos trihalo-acetilo se demostró mediante microscopía de fluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal SEAM 12 para
15 detectar la presencia del polisacárido de cápsula en la cepa productora M7. El enlace del SEAM 12 a M7 complementado con N-acetil-manosamina se detectó como fluorescencia roja del anticuerpo secundario marcado con rodamina de detección (Zymed). Las células se marcaron con el SYTO de tinte de
20 ADN (Molecular Probes, Inc.), el cual aparece como verde. No hubo enlace de SEAM 12 a M7 sin N-acil-manosamina o con el complemento de N-tricloroacetil-manosamina. SEAM 12 no se enlazó con el polisacárido de cápsula que contenía los grupos tricloroacetilo porque el gran tamaño del grupo triclorometilo
25 interrumpe el enlace. Sin embargo, SEAM 12 sí se enlaza al polisacárido de cápsula que contiene los grupos N-trifluoro-

acetilo, debido a que el grupo trifluorometilo es aproximadamente del mismo tamaño que el grupo metilo del derivado de N-acetilo.

El polisacárido se purificó a partir del medio de crecimiento como fue descrito por Guo y Jennings (Guo, Z. y Jennings, H. en 2001. En Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols. A. J. Pollard, y C. J. M. Maiden, eds. Humana Press Inc., Totowa, N. J., página 41). El polisacárido purificado se oxidó, se conjugó con las proteínas portadoras o las aminas grasas mediante aminación reductiva como se describe en lo anterior, y los grupos trihaloacetilo se eliminaron mediante reducción con borohidruro de sodio. El producto final se purificó mediante cromatografía por exclusión de tamaños, como se describe en lo anterior, se dializó en PBS, y se liofilizó.

15

REIVINDICACIONES

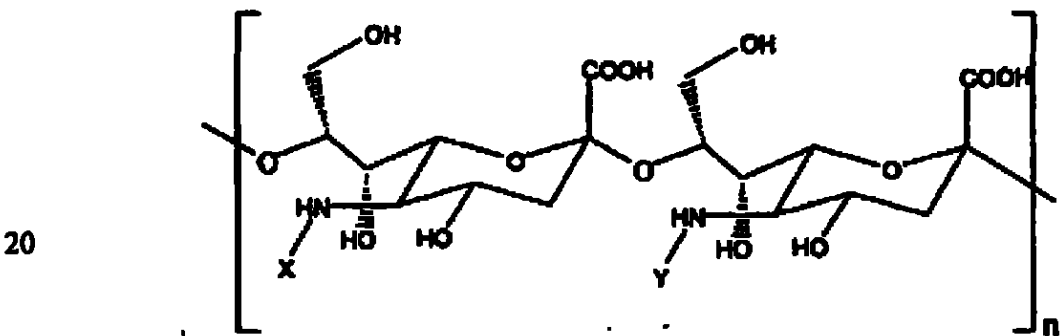
1. Una composición que comprende un adyuvante y un derivado de polisacárido (PS), comprendiendo el derivado de polisacárido cuando menos un dímero de primero y segundo residuos de un ácido siálico o un derivado de ácido siálico, en donde:

el primer residuo está N-acetilado y el segundo residuo comprende un grupo amina libre,

el primer residuo comprende un grupo amina libre y el segundo residuo está N-acetilado, o

los primero y segundo residuos comprenden grupos amina libres.

2. Una composición que comprende un derivado de polisacárido (PS) que comprende una estructura representada por la fórmula:



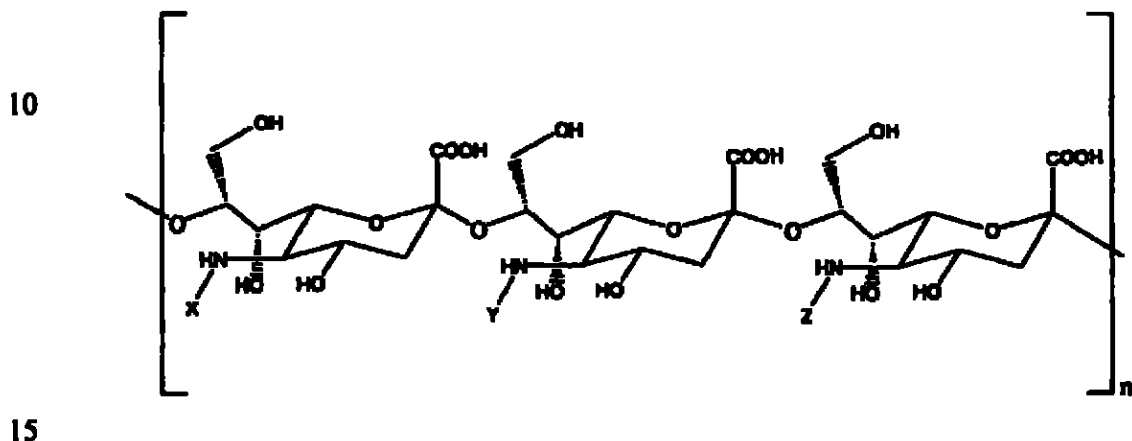
en donde:

X e Y son independientemente H o un grupo acetilo; y

n es cuando menos 1;

en donde el derivado de PS se conjuga con una proteína portadora o además comprende un residuo de ácido siálico que tiene una alquil-amina secundaria en el extremo no reductor del derivado de polisacárido.

- 5 3. Una composición que comprende un derivado de polisacárido (PS) que comprende una estructura representada por la fórmula:



en donde X, Y, y Z son independientemente H o un grupo acilo saturado, con la condición de que cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acilo saturado y

n es cuando menos uno;

- 20 en donde el derivado de polisacárido se conjuga opcionalmente con una proteína portadora o además comprende un residuo de ácido siálico que tiene una alquil-amina secundaria en el extremo no reductor del derivado de polisacárido.

- 25 4. La composición de la reivindicación 3 en donde, cuando dos de X, Y, y Z son grupos acilo, los grupos acilo son diferentes

grupos acilo.

5. La composición de la reivindicación 4, en donde cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acetilo, y cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo propionilo.

5 6. La composición de la reivindicación 3 en donde, cuando X es H, Y y Z son grupos acilo diferentes; cuando X es un grupo acilo, Y y Z son fracciones diferentes, y son H o un grupo acilo; y cuando X es un grupo acilo, Y y Z son fracciones diferentes y son H o un grupo acilo.

10 7. La composición de la reivindicación 6, en donde:
cuando X es H, Y y Z son grupos acilo diferentes seleccionados de acetilo y propionilo;

cuando X es un grupo acetilo, Y y Z son fracciones diferentes y son ya sea H o un grupo propionilo; y

15 cuando X es un grupo propionilo, Y y Z son fracciones diferentes y son ya sea H o un grupo acetilo.

8. La composición de la reivindicación 3, en donde el derivado de polisacárido comprende un residuo de ácido siálico amidado que tiene una alquil-amina secundaria en un término no reductor del derivado de polisacárido.

20 9. La composición de la reivindicación 3, en donde el derivado de polisacárido se conjuga con una proteína portadora.

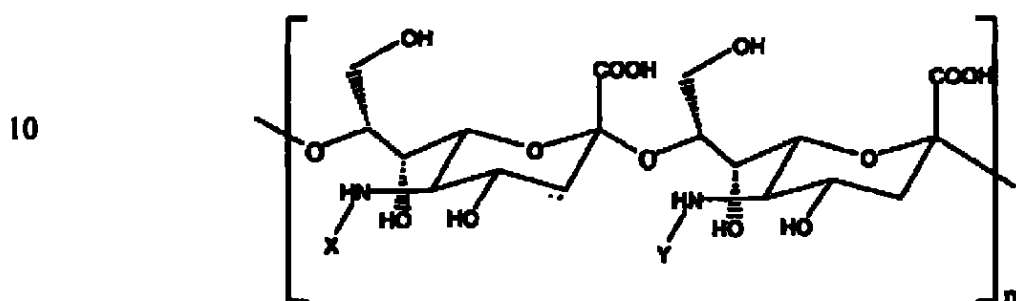
10. Las composiciones de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el derivado de polisacárido comprende un derivado de residuo de ácido siálico que tiene un fracción de lactona o una

25

amina secundaria cíclica.

11. Las composiciones de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el derivado de polisacárido es un compuesto heteropolimérico.

5 12. Una composición que comprende un derivado de polisacárido (PS) que comprende una estructura representada por la fórmula:



en donde:

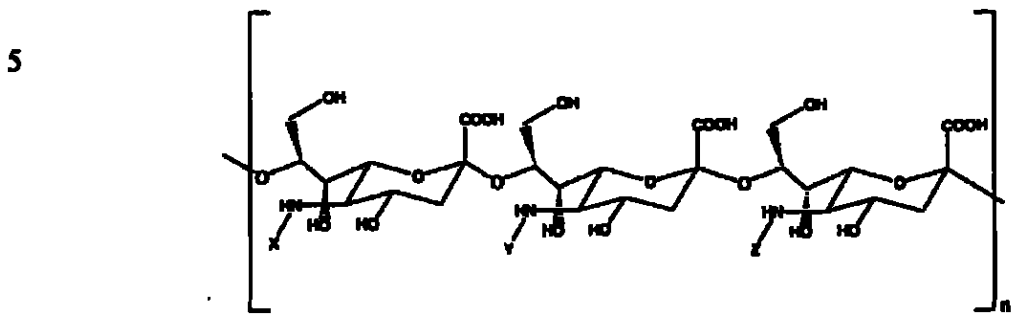
15 X e Y son independientemente un grupo de protección de amina, o un grupo acilo saturado o insaturado; y

n es cuando menos 1;

en donde el derivado de polisacárido comprende además opcionalmente una proteína portadora conjugada con un residuo de
20 ácido siálico del derivado de polisacárido, o comprende además opcionalmente un residuo de ácido siálico amidado que tiene una alquil-amina secundaria en un extremo no reductor del derivado de polisacárido.

25 13. La composición de la reivindicación 12, en donde el grupo acilo es un grupo acilo saturado y acetilo o propionilo.

14. La composición de la reivindicación 12, en donde el derivado de polisacárido comprende una estructura reasentada por la fórmula:



10 en donde X, Y, y Z son independientemente un grupo de protección de amina, con la condición de que cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo de protección de amina, y cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acilo saturado o insaturado; y
n es cuando menos uno.

15 15. La composición de la reivindicación 14, en donde el grupo acilo es un grupo acilo saturado y acetilo o propionilo.

16. Un método para inmunizar a un sujeto, el cual comprende:

20 administrar a un sujeto una cantidad de un derivado de polisacárido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en una cantidad efectiva para provocar una respuesta inmune;

en donde esta administración es efectiva para provocar una respuesta inmune en el sujeto contra el Grupo B de *Neisseria meningitidis*.

25 17. Un método para inmunizar a un sujeto, el cual

comprende:

administrar a un sujeto una cantidad de un derivado de polisacárido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en una cantidad efectiva para provocar una respuesta inmune;

5 en donde esta administración es efectiva para provocar una respuesta inmune en el sujeto contra K1 de *Escherichia coli*.

18. Un método para proporcionar una protección pasiva contra una infección bacteriana, comprendiendo el método:

10 administrar a un sujeto los anticuerpos bactericidas producidos por la inmunización de un huésped con el derivado de polisacárido des-N-acetilado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;

en donde esta administración proporciona protección al sujeto contra el Grupo B de *Neisseria meningitidis*, o contra K1 de
15 *Escherichia coli*.

19. Un método para producir un derivado de polisacárido (PS), comprendiendo el:

hacer reaccionar una molécula de polisacárido cuando menos parcialmente des-N-acetilada con una mezcla que comprende
20 un reactivo de protección de amina y un reactivo acilante, en la presencia de un solvente orgánico;

en donde esta reacción produce un derivado de polisacárido protegido que tiene un grupo de protección de amina y un grupo N-acilado.

25 20. Un derivado de polisacárido protegido (PS) producido

mediante el método de la reivindicación 19.

21. El método de la reivindicación 19, el cual además comprende:

tratar el derivado de polisacárido protegido bajo
5 condiciones para retirar el grupo de protección de amina;
produciéndose un derivado de polisacárido.

22. El método de la reivindicación 19, en donde el método además comprende:

conjuguar el derivado de polisacárido protegido con una
10 proteína portadora para producir un derivado de polisacárido
protegido conjugado; y

tratar el derivado de polisacárido protegido conjugado
bajo condiciones para retirar el grupo de protección de amina;

produciéndose un derivado de polisacárido conjugado.

15 23. El método de la reivindicación 19, en donde el método además comprende:

hacer reaccionar el derivado de polisacárido protegido
con un reactivo de N-acil-amina para producir un derivado de
polisacárido protegido amidado que tiene un residuo de ácido siálico
20 amidado que tiene una alquil-amina secundaria; y

tratar el derivado de polisacárido protegido amidado bajo
condiciones para retirar el grupo de protección de amina;

produciéndose un derivado de polisacárido que tiene
un residuo de ácido siálico amidado que tiene una alquil-amina
25 secundaria.

24. Un método para producir un derivado de polisacárido (PS), comprendiendo el método:

cultivar una bacteria del Grupo B de *Neisseria meningitidis* en un medio de cultivo que comprende N-acil-manosamina y una manosamina protegida con amina, en donde la bacteria es deficiente en la producción de polisacárido de cápsula en ausencia de manosamina complementaria;

en donde este cultivo proporciona la producción de un derivado de polisacárido protegido que tiene un grupo de protección de amina y un grupo N-acilado.

25. El método de la reivindicación 24, en donde el método además comprende:

conjuguar el derivado de polisacárido protegido con una proteína portadora para producir un derivado de polisacárido protegido conjugado; y

tratar el derivado de polisacárido protegido conjugado bajo condiciones para retirar el grupo de protección de amina;

produciéndose un derivado de polisacárido conjugado.

26. El método de la reivindicación 24, en donde el método además comprende:

hacer reaccionar el derivado de polisacárido protegido con un reactivo de N-acil-amina para producir un derivado de polisacárido protegido amidado que tiene un residuo de ácido siálico amidado que tiene una alquil-amina secundaria; y

tratar el derivado de polisacárido protegido amidado bajo

condiciones para retirar el grupo de protección de amina;

produciéndose un derivado de polisacárido que tiene un residuo de ácido siálico amidado que tiene una alquil-amina secundaria.

5 27. Un método para identificar un epítipo de poli-ácido siálico (PSA) enlazado por medio de un anticuerpo, comprendiendo el método:

poner en contacto un derivado de poli-ácido siálico con un anticuerpo, realizándose este contacto bajo condiciones
10 adecuadas para la formación de complejos de antígeno-anticuerpo con el anticuerpo y el derivado de polisacárido; y

poner en contacto el complejo de antígeno-anticuerpo con una sialidasa bajo condiciones adecuadas para retirar los residuos de derivado de poli-ácido siálico accesibles a la sialidasa, del
15 complejo de antígeno-anticuerpo;

en donde los residuos del derivado de poli-ácido siálico restantes en el complejo de antígeno-anticuerpo después del tratamiento con sialidasa, definen un epítipo enlazado por medio del anticuerpo.

RESUMEN

La presente invención en general proporciona composiciones que comprenden un derivado de polisacárido, y métodos para su preparación y uso para la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por bacterias *Neisseria meningitidis*, particularmente cepas (NmB) del grupo B, y por K1 de *E.coli*. La invención proporciona un derivado de polisacárido des-N-acetilado en el cual uno o más residuos del PS han sido modificados por la des-N-acetilación. La invención también incluye derivados en los cuales uno o más de los grupos N-acetilo del PS que contienen los PS des-N-acetilados se reemplazan con otros grupos N-acilo, usualmente un grupo acilo inferior de 2 a 3 átomos de carbono. Además, la invención incluye los derivados de PS des-N-acetilados que contienen hidrocarburos de cadena larga, así como conjugados en los cuales el derivado de PS des-N-acetilado se enlaza a un portador, por ejemplo una proteína portadora.

FIGURA 1

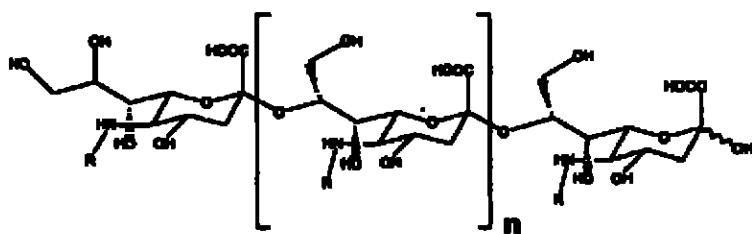


FIGURA 2

Especificidades antigénicas finas para anti-N-Pr NmB PS mAbs ("SEAM") que tienen una reactividad mínima o nula con los antígenos de ácido polislálico humanos ^a

MAB	Subclase IgG	Rectividad con ELISA para N-Ac NmB PS ^b	Inhibición por ELISA del enlace por oligosacáridos N-Pr NmB PS ^c	Reactividad cruzada con PSA humano ^d
SEAM 2	3	0	0	0
SEAM 3	2b	0	+++	0
SEAM 12	2a	++	0	+
SEAM 18	2b	+++	+++	+

^a Datos tomados de Granoff y Moe, patente norteamericana no. 6048,527

^b Enlace An a N-Ac NMb PS; o, OD>0.15, +=D=0.15-0.5; ++ =D=0.5-1.0; +++ OD>1.0 cuando se prueba a 5-25 µg/ml de Ab por medio de ELISA.

^c Inhibición de enlace Ab a N-Pr NmB PS en un ELISA por medio de N-Pr NmB PS (dp<6, promedio Dp=3.98): o, >10%, +21%-48%; ++49%-74%; +++, 75%-100% de inhibición cuando se prueba con [Ab] dando un OD = 0.5 en 30 m.

^d Enlace a ácido polislálico en células de neuroblastoma CHP-134 medido por medio de citometría de flujo de fluorescencia; 0 sin actividad de enlace a PSA cuando se prueba en 100 µg/ml de AB; ++, actividad de enlace detectada a 10 µg/ml de Ab; + actividad de enlace detectada a 100 µg/ml pero no 10 µg/ml.

3/18

FIGURA 3

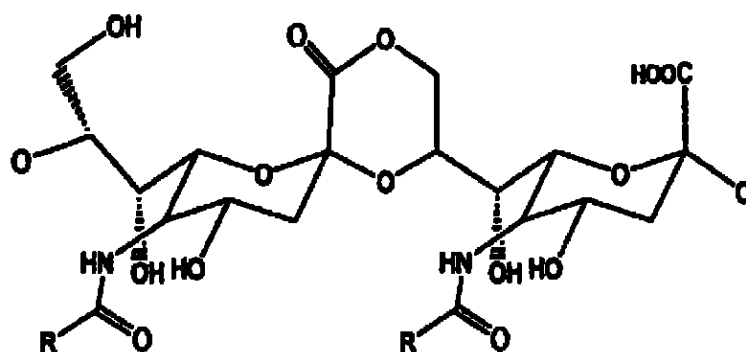


FIGURA 4

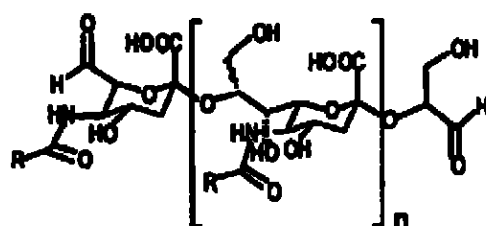


FIGURA 5
Resumen de la Inhibición del enlace de anti-N-Pr NmB PS mAb (SEAM mAb) a N-Pr NmB PS por medio de derivados de PS en ELISA ^a

Inhibidor	SEAM mAb			
	2	3	12	18
NmB PS ^b	>100	>100	>100	>100
Acido colominico	>100	>100	>100	>100
Acido diacetilcolomínico	>100	0.8	>100	1.7
N-Ac NmB PS	>100	0.32	1.2	0.3
Ox N-Ac NmB PS	>100	10.1	>100	12.6
H ⁺ N-Ac NmB PS	>100	1.9	>100	>100
Ox H ⁺ N-Ac NmB PS	>100	13.4	>100	>100
N-Pr NmB PS	0.1	0.004	0.004	0.001
Ox N-Pr NmB PS	<0.02	0.07	<0.02	<0.02
H ⁺ N-Pr NmB PS	1	0.03	0.05	0.03
Ox H ⁺ N-Pr NmB PS	1.5	2.2	1.3	1.8

a Concentraciones en µg/ml inhibiendo 50% del OD máximo 405nm en 30 min
b Aislado de bacterias N. meningitidis grupo B como lo describe Constantino et al. (1999 Vaccine 17:1251).El NmB S usado en este ensayo completamente inhibe el enlace de anti-NmB PS mAb 2-1B que se enlaza a N-Ac NmB OS y N-Pr NmB PS en ELISA, a concentraciones menores a 0.1 µg (no se muestran los datos).

FIGURA 6

Inhibición de la actividad bactericida mediada por complemento de anti-N-Pr NmB PS mABs medida contra la cepa 8047 de *N. meningitidis* grupo B

Inhibidor	Anti-N-Pr NmB PS mAb ^a			
	SEAM 2	SEAM 3	SEAM 12	SEAM 18
N-Ac NmB PSb nativo	>50	>14	>12	>50
Des-N-acetil NmB PS	>50	4	>50	>50
N-acetil NmBPS ^d resintetizado	>50	0.6	>50	12
N-propionil NmB PS ^e	0.03	0.2	0.2	<0.04

^a Concentraciones de derivado de NmB PS (µg/ml) que dan como resultado la inhibición de la actividad bactericida de mABs contra la cepa 8047. La inhibición se definió por 50% de sobrevivencia de bacterias incubadas con complemento y una concentración de mAb que da una sobrevivencia del 0% (esto es 100% de mortalidad) en la ausencia del inhibidor. El CFU/ml a 60min fue >200% del CFU/ml en el momento 0. El mAn Anticapsular 2-1-b de control fue inhibido por NmB PS pero no por ningún otro de los derivado incluyendo N-Ac NmBPS re-sintetizado y un anti-PorA P1.2 de mAB de control no fue inhibido por NmB PS o cualquier derivado de NmB PS. Ninguno de los mABs se inhibieron en 50 µg/ml del polisacárido de *N. meningitidis* grupo A.

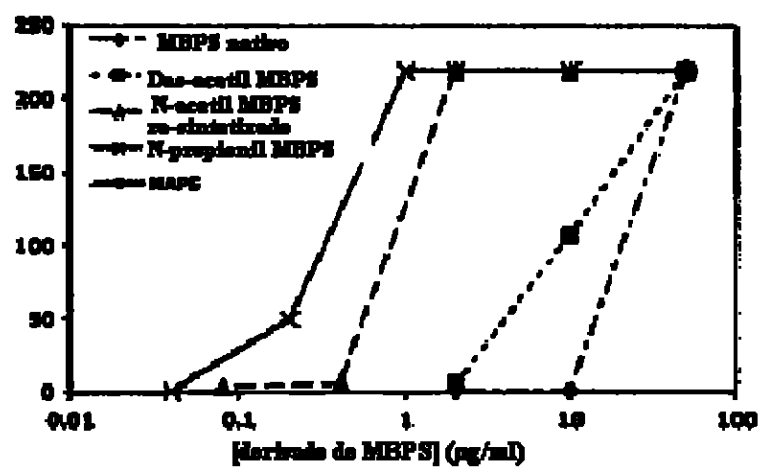
^b Aislados de bacterias de *N. meningitidis* grupo B descritas por Constantino et al. (1999 Vaccine 17:1251)

^c Preparados de *E.coli* K1. El ácido colomínico es química e inmunológicamente idéntico al de NmB PS (Rohr et al. 1980 J. Biol. Chem 255:2332; Bhattacharjee et al. 1975 J. Biol Chem 250:1926) excepto porque algunas cepas de *E. coli* LK1 expresan polisacárido O-acilado C7 o C9 (Orskov et al. 1979 J. Exp. Med. 1949:669).

^d N-Ac NmB PS re-sintetizado que se ha desacetilado y re-N-acetilado como se describe en el Ejemplo 1.

^e NmB PS que se ha desacetilado y N-propionilado como se describe en el Ejemplo 1.

FIGURA 7



7/18

FIGURA 8

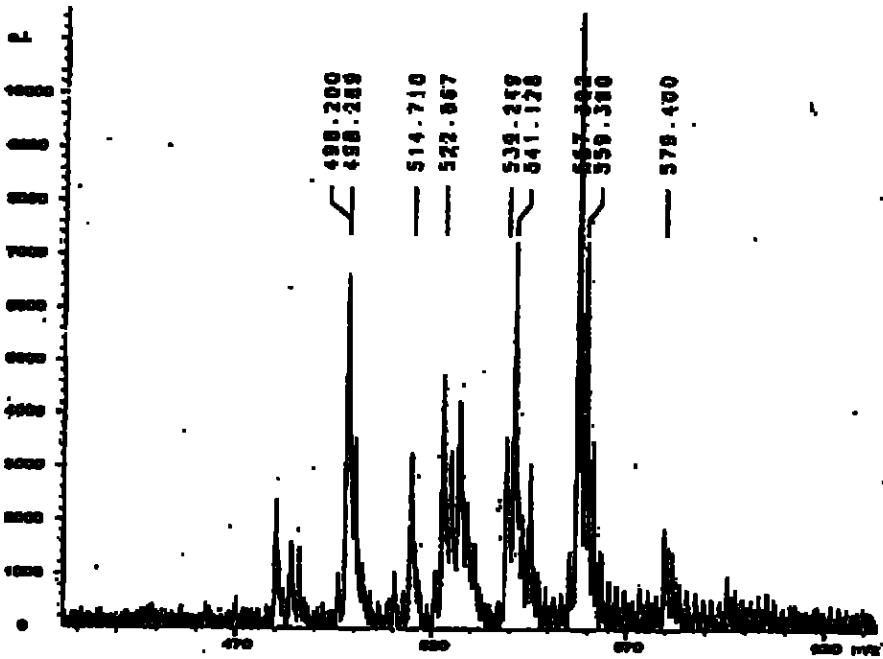


FIGURA 9

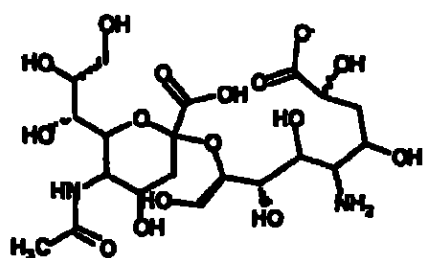
SUMARIO DE DATOS MS PARA

Estructura Ion Positivo	Masa Calculada (Daltons)		Seleccionar "SEAM" anticuerpo monoclonal			
			2	3	12	18
	Monoisotopica	Promedio	Masa/Carga Observada			
[II+Na+]-	579.16	579.46	579.378	579.400	579.482	1. 579.328
[I]	559.20	559.50	559.290	559.390	559.314	559.525
[III]-	557.18	557.48	557.289	557.392	557.403	557.305
[III ó IV]-	541.17	541.45	541.162	541.128	541.168	-
[V]	539.17	539.46	539.169	539.249	539.157	-
[VI]	523.18	523.47	522.731	522.867	522.813	-
[VII]-	515.17	515.44	514.540	514.710	514.616	-
[II-CH2O]-	527.17	527.45	-	-	526.975	526.991
[Mezcla de VII, VIII]-	499.18,					
	497.16		409.219	498.289	498.273	-

El error estimado para las masas observadas es ± 0.1%

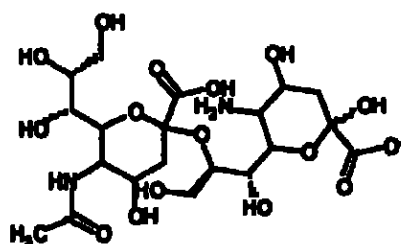
9/18

FIGURA 10
Estructura I



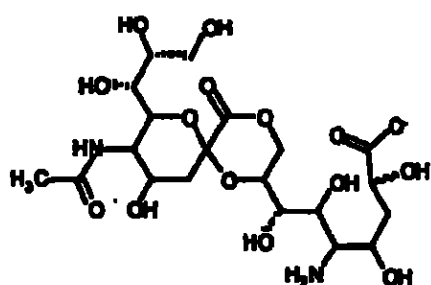
$C_{20}H_{35}N_2O_{16}^-$
Masa Exacta: 559.20
Peso Molecular: 559.50
C, 42.93; H, 6.31; N, 5.01; O, 45.75

FIGURA 11
Estructura II



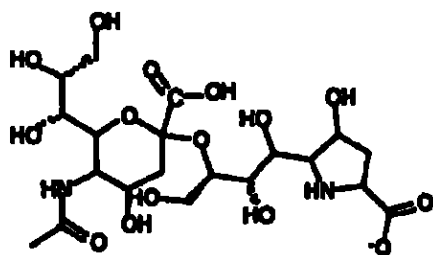
$C_{20}H_{33}N_2O_{16}^-$
Masa Exacta: 557.18
Peso Molecular: 557.48
C, 43.09; H, 5.97; N, 5.03; O, 45.92

FIGURA 12
Estructura III



$C_{20}H_{33}N_2O_{15}^-$
Masa Exacta: 541.19
Peso Molecular: 541.48
C, 44.36; H, 6.14; N, 5.17; O, 44.32

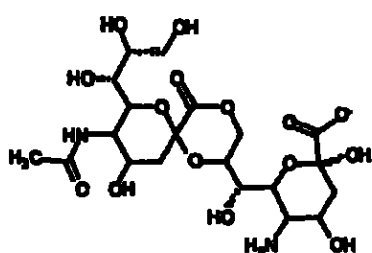
FIGURA 13
Estructura IV



$C_{20}H_{33}N_2O_{15}^-$
Masa Exacta: 541.19
Peso Molecular: 541.48
C, 44.36; H, 6.14; N, 5.17; O, 44.32

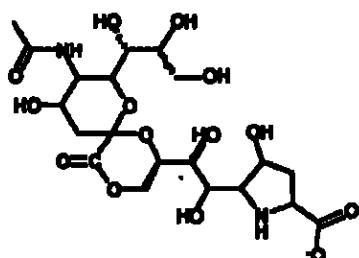
10/18

FIGURA 14
Estructura V



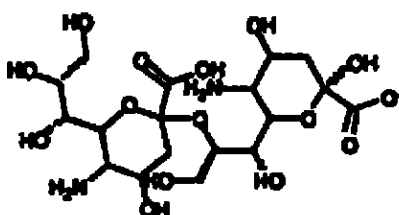
$C_{20}H_{31}N_2O_{16}^-$
Masa Exacta: 539.17
Peso Molecular: 539.46
C, 44.53; H, 5.79; N, 5.19; O, 44.49

FIGURA 15
Estructura VI



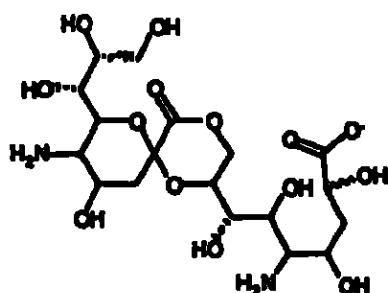
$C_{20}H_{31}N_2O_{14}^-$
Masa Exacta: 523.18
Peso Molecular: 523.47
C, 45.89; H, 5.97; N, 5.35; O, 42.79

FIGURA 16
Estructura VII



$C_{18}H_{31}N_2O_{16}^-$
Masa Exacta: 515.17
Peso Molecular: 515.44
C, 41.94; H, 6.06; N, 5.43; O, 46.56

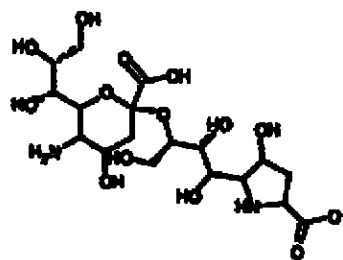
FIGURA 17
Estructura VI



$C_{18}H_{31}N_2O_{14}^-$
Masa Exacta: 499.18
Peso Molecular: 499.44
C, 43.29; H, 6.26; N, 5.61; O, 44.85

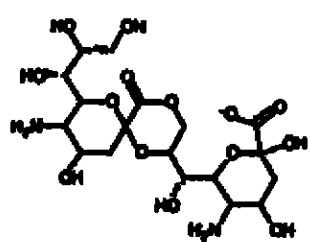
11/18

FIGURA 18
Estructura VII



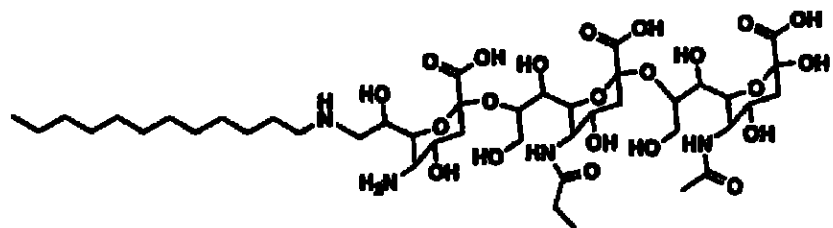
$C_{18}H_{31}N_2O_{14}^-$
Masa Exacta: 499.18
Peso Molecular: 499.44
C, 43.29; H, 6.26; N, 5.61; O, 44.85

FIGURA 19
Estructura VIII



$C_{18}H_{29}N_2O_{14}^-$
Masa Exacta: 497.16
Peso Molecular: 497.43
C, 43.46; H, 5.88; N, 5.63; O, 45.03

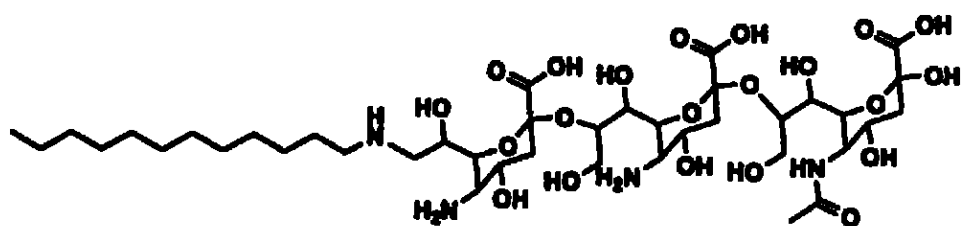
FIGURA 20



Masa Exacta: 1000.5

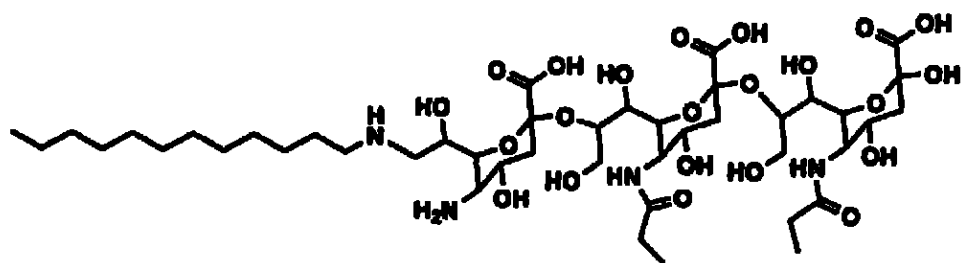
12/18

FIGURA 21



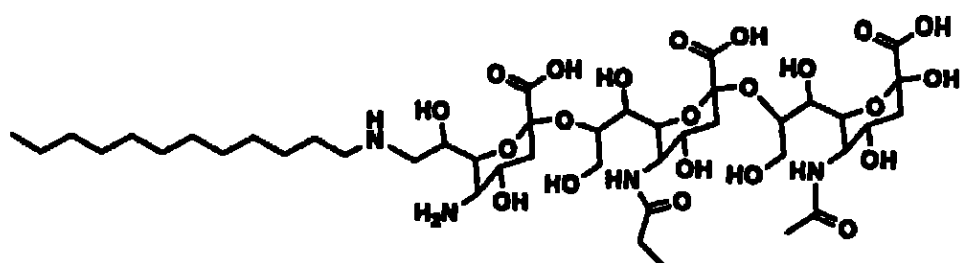
Masa Exacta: 944.47

FIGURA 22

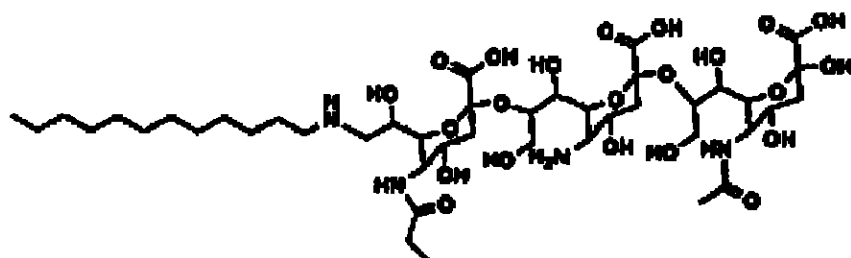


Masa Exacta: 1014.51

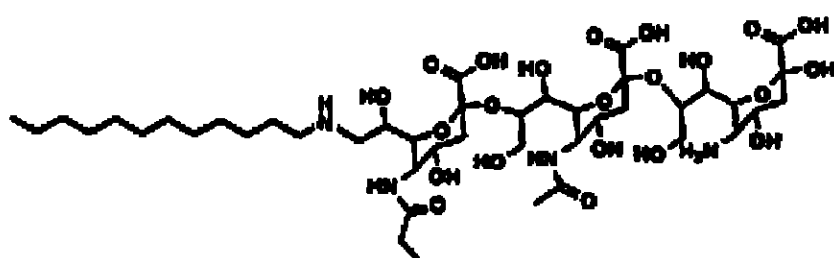
FIGURA 23



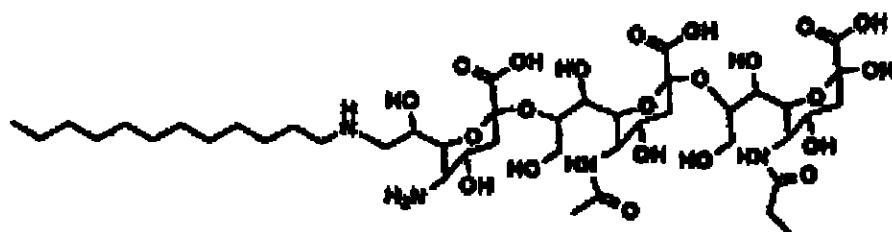
Masa Exacta: 1000.5

FIGURA 24

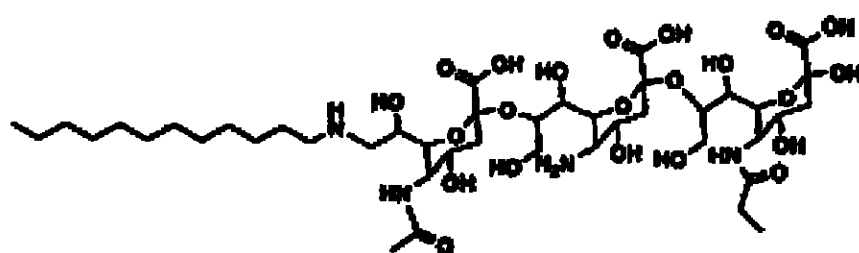
Masa Exacta: 1000.5

FIGURA 25

Masa Exacta: 1000.5

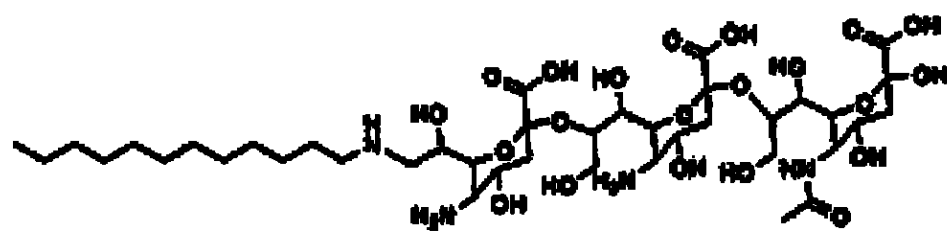
FIGURA 26

Masa Exacta: 1000.5

FIGURA 27

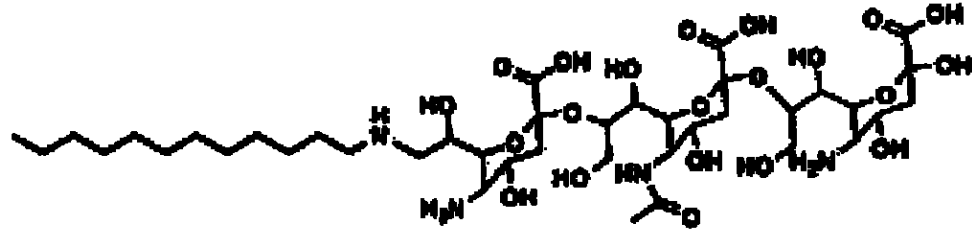
Masa Exacta: 1000.5

FIGURA 32



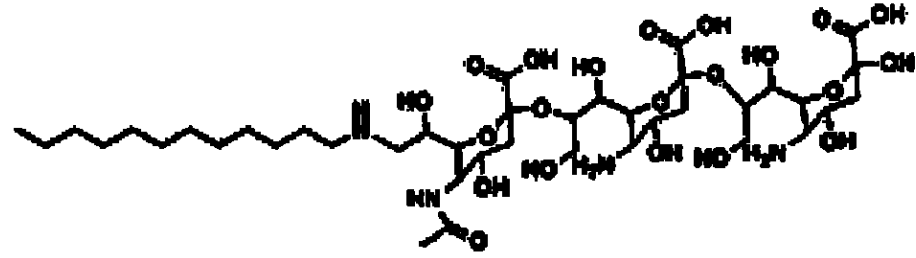
Masa Exacta: 944.47

FIGURA 33



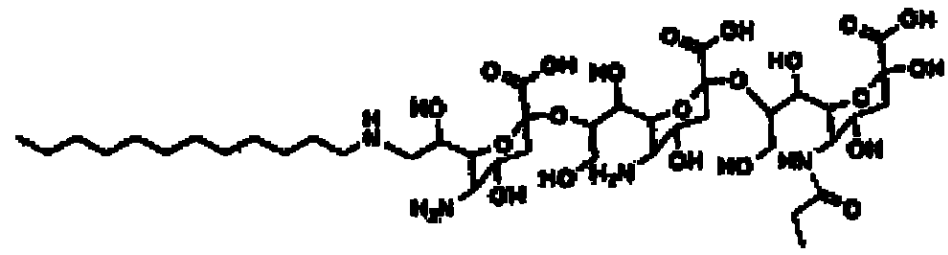
Masa Exacta: 944.47

FIGURA 34

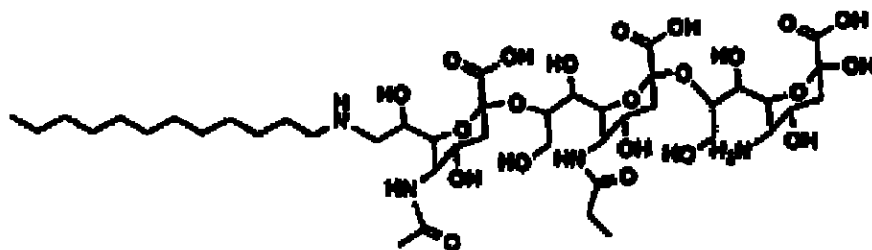


Masa Exacta: 944.47

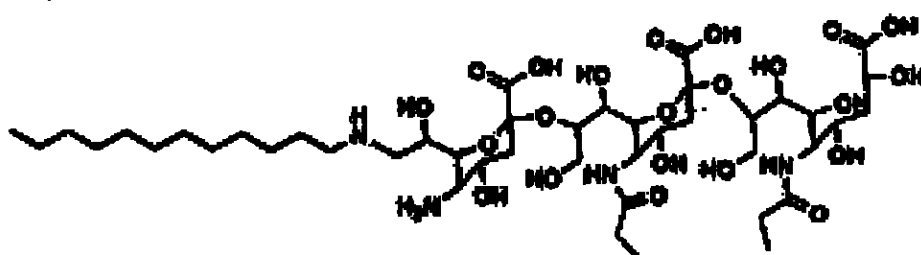
FIGURA 35



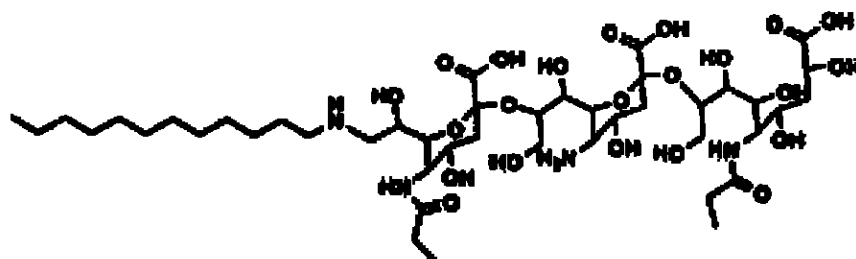
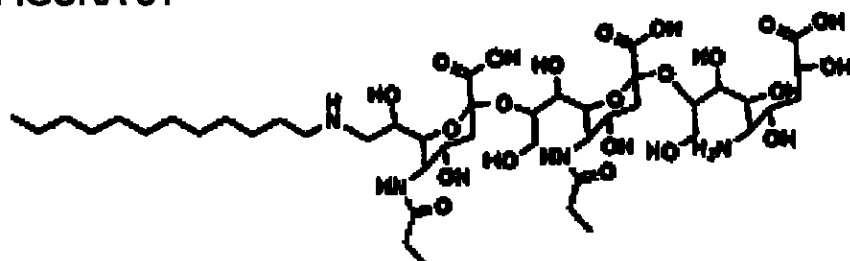
Masa Exacta: 958.48

FIGURA 28

Masa Exacta: 1000.5

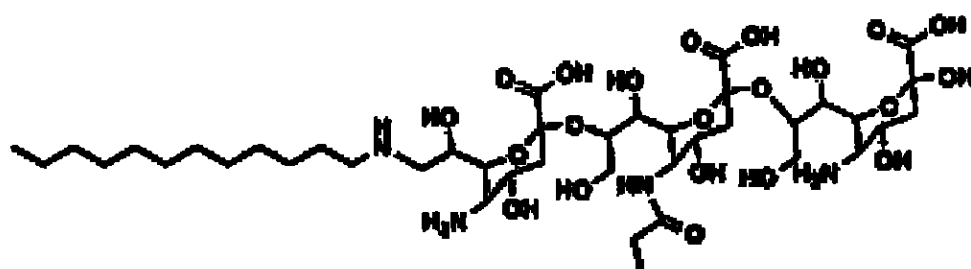
FIGURA 29

Masa Exacta: 1016.53

FIGURA 30**Masa Exacta: 1016.53****FIGURA 31****Masa Exacta: 1016.53**

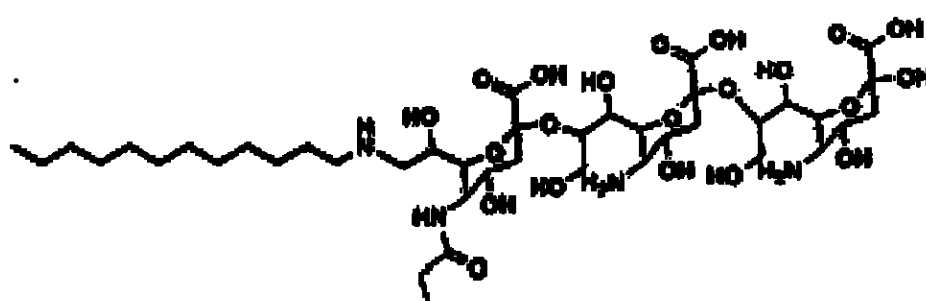
16/18

FIGURA 36



Masa Exacta: 958.48

FIGURA 37



Masa Exacta: 958.48

Figura 38

Concentración final para enlace mAb a antígenos de dodecilamina PS determinados por ELISA de enlace directo ^{a,b}

SEAM mAb	Final no-reducido MBPS	Dodecil N-Ac MBOS/PS No reducido		Dodecil N-Pr MBOS/PS No reducido	
		OS, Dp<7	PS,DP<7	OS, Dp<7	PS, Dp>14
	Dp>14				
2	>10	>10	>10	>10	0.94
3	>10	0.05	0.05	0.030	0.03
12	0.52	0.37	0.29	0.110	0.01
18	>10	>10	>10	0.870	0.05
35	>10	>10	>10	5.730	0.5

^a concentración de mAb en microgramos/ml requeridos para dar un OD_{405 nm} igual a 0.5 en 1 hora por medio de ELISA con derivados de MBPS de docecilamina con extremo no reductos recubierto en la placa y unido a mAb detectado usando IgG de cabra anti-ratón, M, anticuerpo secundario de conjugado de fosfatasa alcalina A tal como se describe antes.

^b Preparación y composición de derivados MBS son como se describe en el texto, Se uso ácido colomínico para preparar este derivado. Ya que el ácido colomínico de una cepa de *E. coli* K1 que no O-acetila los grupos hidroxilo en C7 y C9; el polisacárido es químicamente idéntico al polisacárido grupo B meningocócico (MBPS). N-Pr, N-propionilo; N-Ac, N-acetilo; OS oligosacárido; PS polisacárido; Dp, grado de polimerización

Figura 39
Concentración final para enlace mAb a antígenos conjugados de derivados de BSA-PS determinados por ELISA de enlace directo ^{a,b}

SEAM mAb	MBPS Final no-reducido	N-Ac MBOS/PS dodecil Final no-reducido		N-Pr MBOS/PS dodecil Final no-reducido	
		OS, Dp<7	PS, DP<7	OS, Dp<7	PS, Dp>14
	Dp>14				
2	>10	>10	>10	4.8	3.8
3	>10	0.012	0.014	0.018	0.018
12	0.52	0.18	0.14	0.01	0.02
18	>10	>10	>10	0.07	0.007
35	>10	>10	>10	33	0.23

^a concentración de mAb en microgramos/ml requeridos para dar un OD₄₀₅ nm igual a 0.5 en 1 hora por medio de ELISA con derivados de MBPS de docecilamina con extremo no reductos recubierto en la placa y unido a mAb detectado usando IgG de cabra anti-ratón, M, anticuerpo secundario de conjugado de fosfatasa alcalina A tal como se describe antes.

^b Preparación y composición de derivados MBS son como se describe en el texto, Se uso ácido colomínico para preparar este derivado. Ya que el ácido colomínico de una cepa de *E. coli* K1 que no O-acetila los grupos hidroxilo en C7 y C9; el polisacárido es químicamente idéntico al polisacárido grupo B meningocócico (MBPS). N-Pr, N-propionilo; N-Ac, N-acetilo; OS oligosacárido; PS polisacárido; Dp, grado de polimerización

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference CHOR-009WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/022590	International filing date (day/month/year) 23/06/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 23/06/2004
Applicant CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the International search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C08B37/00 A61K39/095		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C08B A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
G. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 350 449 B1 (JENNINGS HAROLD J ET AL) 26 February 2002 (2002-02-26) cited in the application column 4, line 47 - column 5, line 15 column 5, line 61 - column 6, line 3 column 6, lines 55-59 examples 1,3,8; table 1 ----- -/-	2-23
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search 22 February 2006		Date of mailing of the International search report 03/03/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Lanz, S

156

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JENNINGS H J ET AL: "INDUCTION OF MENINGOCOCCAL GROUP B POLYSACCHARIDE-SPECIFIC IGG ANTIBODIES IN MICE BY USING AN N-PROPIONYLATED B POLYSACCHARIDE- TETANUS TOXOID CONJUGATE VACCINE" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 137, no. 5, 1 September 1986 (1986-09-01), pages 1708-1713, XP002052677 ISSN: 0022-1767 page 1710, left-hand column, paragraph 1 figure 2	1-23
X	US 2002/034518 A1 (SEID ROBERT) 21 March 2002 (2002-03-21) example 1	1-23
A	WO 02/09744 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA; JENNINGS, HAROLD, J; ZOU, WEI; BO) 7 February 2002 (2002-02-07) table 4	24-26
A	WO 01/09298 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 8 February 2001 (2001-02-08) example 3	24-27
X	R. ROY, R. A. PON: "Efficient Synthesis of alpha(2-8)-linked N-Acetyl and N-Glycolylneuraminic Acid Disaccharides from Colominic acid" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 7, 1990, pages 3-12, XP009062285 the whole document	3,12,19, 20

INTL JATI NAL SEARCH REP RT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2005/022590

197

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6350449	BI	26-02-2002	NONE	
US 2002034518	A1	21-03-2002	US 2004052805 A1	18-03-2004
WO 0209744	A	07-02-2002	AU 7832301 A	13-02-2002
			CA 2417574 A1	07-02-2002
			EP 1307221 A2	07-05-2003
			US 2004009195 A1	15-01-2004
WO 0109298	A	08-02-2001	AU 6420000 A	19-02-2001
			CA 2279134 A1	29-01-2001
			EP 1198244 A2	24-04-2002
			JP 2003506034 T	18-02-2003
			MX PA02000958 A	21-07-2003
			ZA 200200731 A	28-01-2003

PATENT COOPERATION TREATY

198

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2005/022590

International filing date (day/month/year)
23.06.2005

Priority date (day/month/year)
23.06.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C08B37/00, A61K39/095

Applicant
CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80295 Munich
Tel. +49 89 23699 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 23699 - 4465

Authorized Officer

Lanz, S

Telephone No. +49 89 23699-7889



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/022590

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ in written format
 - ☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/022590

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/a.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	24-27
	No: Claims	1-3,6-23
Inventive step (IS)	Yes: Claims	24-27
	No: Claims	1-23
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-15,19-27
	No: Claims	16-18

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, Inventive step or Industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

1. Reference is made to the following documents:

- D1: US-B1-6 350 449 (JENNINGS HAROLD J ET AL) 26 February 2002 (2002-02-26)
- D2: JENNINGS H J ET AL: "INDUCTION OF MENINGOCOCCAL GROUP B POLYSACCHARIDE-SPECIFIC IGG ANTIBODIES IN MICE BY USING AN N-PROPIONYLATED B POLYSACCHARIDE- TETANUS TOXOID CONJUGATE VACCINE" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 137, no. 5, 1 September 1986 (1986-09-01), pages 1708-1713, XP002052677 ISSN: 0022-1767
- D3: US 2002/034518 A1 (SEID ROBERT) 21 March 2002 (2002-03-21)
- D4: WO 02/09744 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA; JENNINGS, HAROLD, J; ZOU, WEI; BO) 7 February 2002 (2002-02-07)
- D5: WO 01/09298 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 8 February 2001 (2001-02-08)
- D6: R. ROY, R. A. PON: "Synthesis of alpha(2-8)-linked N-Acetyl and N-Glycolyneuraminic Acid Disaccharides from Colominic acid" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 7, 1990, pages 3-12, XP009062285

A. Claims 1-15,19-27

- 1. Document D1 discloses the deacetylation of a group B meningococcal polysaccharide (GBMP). The degree of deacetylation is 30-100% (see column 4, lines 47-65). The partially deacetylated polysaccharide comprises NH-acetyl and NH₂-groups. Example 1 discloses the preparation of a N-acyl derivative from a N-deacetylated group B meningococcal polysaccharide (GBMP). A N-propionyl-derivative can also be prepared (see table 1). The N-propionation leads to a compound comprising N-acetyl and N-propionyl groups if deacetylation was partially. The degree of N-acylation is preferable

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/022590

close to 100% (see column 4, line 66 - column 5, line 15). Both groups (acetyl and propionyl group) can be considered to be an amine protecting group and an acyl group. Example 3 discloses the conjugation of the N-acylated polysaccharide with tetanus toxoid (corresponds to the carrier protein; see column 5, line 61 - column 6, line 3). These polysaccharides are used as vaccines against *N. meningitidis* or *E. coli* K1 (see column 6, lines 55-59).

Therefore document D1 destroys novelty of subject-matter of claims 2,3,6-15,19-23 of the present application. The subject-matter of claims 4 and 5 deems not to involve an inventive step.

2. Document D2 discloses the partial deacetylation of group B meningococcal polysaccharide (GBMP)(see figure 2). The obtained product contains NH_2 and NHAc groups. Document D2 discloses also partial N-propionylation of a N-deacetylated polysaccharide (see page 1710, left column, first paragraph).

Therefore document D2 destroys novelty of subject-matter of claims 1-3,6-15,19-23 of the present application. The subject-matter of claims 4 and 5 deems not to involve an inventive step.

3. Example 1 of document D3 discloses the preparation of a group B meningococcal polysaccharide (MenB PS) derivative by first deacetylating it quantitatively, followed by partial N-propionylation (84%). The obtained product has therefore NH_2 and NHPr groups.

Therefore document D3 destroys novelty of subject-matter of claims 1-3,6-15,19-23 of the present application. The subject-matter of claims 4 and 5 deems not to involve an inventive step.

4. Document D6 discloses partially N-deacetylated colominic acid (see Figure 1), followed by acylation (see Figure 2).

**WRITTEN PART OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/022590

Therefore document D6 destroys novelty of subject-matter of independent claims 3,12,19,20 of the present application.

5. The subject-matter of claims 24-27 of the present application deems to be novel and inventive over the subject-matter of documents D1-D6.

B. Claims 16-18

Claims 16-18 concern a method for the treatment of the human or animal body. These claims would therefore not be in agreement with Article 52 EPC.

Furthermore the subject-matter of claims 16-18 deems not to be novel over documents D1-D3.

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

PCT

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo PCT 18 y Reglas 43 y 44)

Referencia del archivo del solicitante o agente CHOR-009WO	PARA ACCIÓN FUTURA ver Forma PCT/ISA/220 así como, si aplica, el punto 5 a continuación.	
Solicitud internacional. No. PCT/ US2005 / 022590	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 23/08/2005	(Primera) Fecha de Prioridad (día/mes/año) 23/08/2004
Solicitante CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND		

Este Reporte de Búsqueda Internacional fue preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y se transmite al solicitante de acuerdo con el Artículo 18. Una copia se transmite a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consiste de un total de 4 hojas.

1. Base del reporte

a. Con respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo con base en

- ☒ la solicitud internacional en el lenguaje en que se presentó
☐ La traducción de la solicitud internacional en _____, que es el lenguaje de una traducción proporcionada para los propósitos de la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))

b. ☐ Con respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia de aminoácidos divulgada en la solicitud internacional, ver el Recuadro I.

2. ☐ Ciertas reivindicaciones no pudieron ser buscadas (Ver Recuadro II).

3. ☐ Falta Unidad de Invención (Ver Recuadro III).

4. Con respecto al título,

- ☒ el texto es aprobado como lo presentó el solicitante.
☐ el texto ha sido establecido por esta Autoridad para que diga lo siguiente:

5. Con respecto al resumen,

- ☒ el texto es aprobado como lo presentó el solicitante.
☐ el texto ha sido establecido, de acuerdo con la Regla 38.2(b), por esta Autoridad como aparece en el Recuadro IV. El solicitante puede, dentro del plazo de un mes a partir de la fecha de envío de este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Con respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que será publicada con el resumen es la Figura No. _____

- ☐ como lo sugiere el solicitante.
☐ por que el solicitante falla en sugerir una figura.
☐ por que esta figura caracteriza mejor la invención.
- ☐ Ninguna de las figuras

b. ☒ ninguna de las figuras será publicada con el resumen

205

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT /US 2005 /022590

A. CLASIFICACIÓN DE LA MATERIA
 C08B37/00 A81K39/088

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o tanto con la clasificación nacional e IPC.

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)
 C08B A81K

Documentación buscada aparte de la documentación mínima en la medida en que dichos documentos están incluidos en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, términos de búsqueda usados)

EPO-Interno, PAJ, Datos WPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría	Cita del documento con indicación, si es necesaria, de los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación No.
X	US 6 350 449 B1 (JENNINGS HAROLD J ET AL) 28 de febrero de 2002 (2002-02-28) citado en la solicitud columna 4, líneas 47 – columna 6, línea 15 columna 5, líneas 61 – columna 6, línea 3 columna 6, líneas 55-59 ejemplos 1, 3, 8; tabla 1 ----- - / -	2-23

☒ Documentos adicionales enlistados en la continuación del recuadro C. ☐ Miembros de familia de patente enlistados en anexo.

Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera de relevancia particular "E" documento anterior publicado en o después de la fecha de presentación internacional "L" documento que podría poner en duda reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita u otra razón especial (como se especifica) "O" documento que se refiere a una divulgación oral, uso exhibición u otro medio "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reclamada	"T" documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no entra en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría subyacente de la invención "X" documento de relevancia particular; la invención reclamada no puede considerarse nueva o como que involucra una actividad inventiva cuando el documento es tomado solo "Y" documento de relevancia particular; la invención reclamada no puede considerarse como que involucra una actividad inventiva cuando se combina con uno o más documentos, dicha combinación es obvia para una persona con habilidad en la técnica "S" documento miembro de la misma familia de patente
Fecha de finalización real de la búsqueda internacional 22 de febrero de 2008	Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional 03/03/2008
Nombre y dirección de la ISA Oficina Europea de Patentes, P. B. 5018 Patentamt 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel: (+ 31 – 70) 340-3040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+ 31 – 70) 340-3018	Funcionario autorizado Lanz, S

206

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT /US 2005 /022590

C(Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Cita del documento con indicación, si es necesaria, de los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación No.
X	JENNINGS H J ET AL: "INDUCTION OF MENINGOCOCCAL GROUP B POLYSACCHARIDE-SPECIFIC IGG ANTIBODIES IN MICE BY USING AN N-PROPYONYLATED B POLYSACCHARIDE- TETANUS TOXOID CONJUGATE VACCINE" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Vol. 137, no. 5, 1 de septiembre de 1986 (1986-09-01), páginas 1708-1713, XP002052677 ISSN: 0022-1767 Página 1710, columna izquierda, párrafo 1 Figura 2	1-23
X	US 2002/034518 A1 (SEID ROBERT) 21 de marzo de 2002 (2002-03-21) ejemplo 1	1-23
A	WO 02/08744 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA; JENNINGS, HAROLD J; ZOU, WEI; BO) 7 de febrero de 2002 (2002-02-07) Tabla 4	24-26
A	WO 01/09298 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 8 de febrero de 2001 (2001-02-08) Ejemplo 3	24-27
X	R. ROY, R. A. PON: "Efficient Synthesis of alpha (2-8) - linked N-Acetyl and N- Glycolylneuraminic Acid Disaccharides from Colominic acid" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Vol. 7, 1990, páginas 3-12, XP009082285 Todo el documento	3, 12, 19, 20

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

**Solicitud Internacional No.
PCT /US 2005 /022580**

Documento de Patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patente	Fecha de Publicación
US 6350449 B1	26-02-2002	NINGUNA	
US 2002034518 A1	21-03-2002	US 2004052805	18-03-2004
WO 0208744 A	07-02-2002	AU 7832301 A CA 2417574 A1 EP 1307221 A2 US 2004009195 A1	13-02-2002 07-02-2002 07-05-2003 15-01-2004
WO 0108288 A	08-02-2001	AU 6420000 A CA 2279134 A1 EP 1198244 A2 JP 2003508034 T MX PA02000858 A ZA 200200731 A	18-02-2001 29-01-2001 24-04-2002 18-02-2003 21-07-2003 28-01-2003

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
De la AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para: ver forma PCT/ISA/220		PCT OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL (Regla PCT 43bis.1)									
		a de Envío (mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)									
Referencia de archivo del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/210		PARA ACCIÓN FUTURA									
Ver párrafo 2 a continuación											
No. Solicitud Internacional PCT /JS 2005 /022590	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 23.06.2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 23.06.2004									
Clasificación de Brevetos Internacional (IPC) y tests clasificatoria nacional como IPC											
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes puntos: ☒ Recuadro I Bases de esta opinión ☐ Recuadro II Prioridad ☐ Recuadro III No- establecimiento de opinión con respecto a novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial ☐ Recuadro IV Falta de unidad en la invención ☒ Recuadro V Declaración razonada según Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que soportan dicha declaración ☐ Recuadro VI Ciertos documentos citados ☐ Recuadro VII Ciertos defectos en la solicitud internacional ☐ Recuadro VIII Ciertas observaciones en la solicitud internacional <tr><td colspan="4"> 2. ACCIÓN FUTURA Si una demanda se hace para examen preliminar internacional, esta opinión normalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge otra Autoridad para ser la IPEA y la IPEA escogida ha notificado a la Oficina Internacional según Regla 66.1bis(b) que las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional no serán consideradas. Si esta opinión, como se proporciona arriba, es considerada como una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar a la IPEA una respuesta escrita junto con enmiendas, si es apropiado, antes de la fecha de vencimiento de tres meses a partir de la fecha de envío de la Forma PCT/ISA/220 o antes del vencimiento de los 22 meses a partir de la fecha de prioridad, lo que expira después. Para opciones adicionales, ver Forma PCT/ISA/220. </td></tr> <tr><td colspan="4"> 3. Para más detalles, ver notas de Forma PCT/ISA/220. </td></tr>				2. ACCIÓN FUTURA Si una demanda se hace para examen preliminar internacional, esta opinión normalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge otra Autoridad para ser la IPEA y la IPEA escogida ha notificado a la Oficina Internacional según Regla 66.1bis(b) que las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional no serán consideradas. Si esta opinión, como se proporciona arriba, es considerada como una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar a la IPEA una respuesta escrita junto con enmiendas, si es apropiado, antes de la fecha de vencimiento de tres meses a partir de la fecha de envío de la Forma PCT/ISA/220 o antes del vencimiento de los 22 meses a partir de la fecha de prioridad, lo que expira después. Para opciones adicionales, ver Forma PCT/ISA/220.				3. Para más detalles, ver notas de Forma PCT/ISA/220.			
2. ACCIÓN FUTURA Si una demanda se hace para examen preliminar internacional, esta opinión normalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge otra Autoridad para ser la IPEA y la IPEA escogida ha notificado a la Oficina Internacional según Regla 66.1bis(b) que las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional no serán consideradas. Si esta opinión, como se proporciona arriba, es considerada como una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar a la IPEA una respuesta escrita junto con enmiendas, si es apropiado, antes de la fecha de vencimiento de tres meses a partir de la fecha de envío de la Forma PCT/ISA/220 o antes del vencimiento de los 22 meses a partir de la fecha de prioridad, lo que expira después. Para opciones adicionales, ver Forma PCT/ISA/220.											
3. Para más detalles, ver notas de Forma PCT/ISA/220.											

Nombre y dirección de la ISA Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523858 epmu d Fax: + 49 89 2399 - 4485	Funcionario autorizado Lanz, S (SELLO) Tel. +49 89 2399 - 7889
--	---

Forma (PCT/ISA/237) (Portada) (enero 2004)

**OPINIÓN ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/ US 2005 / 022590

Recuadro I Bases de esta opinión

1. Con respecto al lenguaje, esta opinión se ha establecido con base en la solicitud internacional en el lenguaje en que se presentó, a menos que se indique lo contrario en este punto.
 - ☐ Esta opinión se ha establecido con base en una traducción del lenguaje original al siguiente lenguaje , que es el lenguaje de la traducción proporcionada para los propósitos de la búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1(b)).
2. Con respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia de amino ácido divulgada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reclamada, esta opinión se ha establecido con base en:
 - a. tipo de material:
 - ☐ un listado de secuencia
 - ☐ tabla(s) relacionadas con el listado de secuencia
 - b. formato del material:
 - ☐ en formato escrito
 - ☐ en formato legible por computadora
 - c. tiempo de presentación/ entrega:
 - ☐ contenido en la solicitud internacional como se presentó
 - ☐ presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por computadora
 - ☐ entregado subsiguientemente a esta Autoridad para los propósitos de la búsqueda
3. ☐ Además, en caso de que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada haya sido presentada o entregada, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud como se presentó o que no van más allá de la solicitud como se presentó, si es apropiado, fueron entregadas.
4. Comentarios adicionales:

Recuadro V Declaración razonada según Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que soportan dicha declaración

1. Declaración

Novedad (N)	Sí:	reivindicaciones	24-27
	No:	reivindicaciones	1-3, 6-23
Actividad Inventiva (IS)	Sí:	reivindicaciones	24-27
	No:	reivindicaciones	1-23
Aplicabilidad Industrial (IA)	Sí:	reivindicaciones	1-15, 19-27
	No:	reivindicaciones	16-18

2. Citas y explicaciones

ver hoja separada

Re Punto V

Declaración razonada según Regla 43b/s.1(a)(i) con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que soportan dicha declaración

1. **Se hace referencia a los siguientes documentos:**

D1: US-B1-6 350 449 (JENNINGS HAROLD J ET AL) 26 de febrero de 2002 (2002-02-26)

D2: JENNINGS H J ET AL: "INDUCTION OF MENINGOCOCCAL GROUP B POLYSACCHARIDE-SPECIFIC IGG ANTIBODIES IN MICE BY USING AN N-PROPIONYLATED B POLYSACCHARIDE- TETANUS TOXOID CONJUGATE VACCINE" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Vol. 137, no. 5, 1 de septiembre de 1986 (1986-09-01), páginas 1708-1713, XP002052677 ISSN: 0022-1767

D3: US 2002/034518 A1 (SEID ROBERT) 21 de marzo de 2002 (2002-03-21)

D4: WO 02/09744 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA; JENNINGS, HAROLD J; ZOU, WEI; BO) 7 de febrero de 2002 (2002-02-07)

D5: WO 01/09298 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 8 de febrero de 2001 (2001-02-08)

D6: R. ROY, R. A. PON: "Synthesis of alpha (2-8) – linked N-Acetyl and N- Glycolylneuraminic Acid Disaccharides from Colominic acid" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Vol. 7, 1990, páginas 3-12, XP009062285

A. Relvindicaciones 1-15, 19-27

1. **El Documento D1 divulga la desacetilación de polisacáridos meningococcal grupo B (GBMP). El grado de desacetilación es de 30-100% (ver columna 4, líneas 47-65). El polisacárido parcialmente desacetilado comprende grupos NH-acetyl y NH₂. El ejemplo 1 divulga la preparación de un derivado N-acyl desde un polisacárido meningococcal grupo B (GBMP) N-desacetilado. Un derivado de N-propionil también se puede preparar (ver tabla 1). La N-propionación lleva a un compuesto que comprende grupos N-acetyl y N-propionil si la desacetilación fue parcial. El grado de N-acilación es preferible cerca de 100% (ver columna 4, línea 66 – columna 5, línea 15). Ambos grupos (grupo acetyl y propionil) pueden considerarse como un grupo protector de amina y un grupo acyl.**

El ejemplo 3 divulga la conjugación del polisacárido N-acetilado con toxoide de tétanos (corresponde a la proteína portadora; ver columna 5, línea 61 – columna 6, línea 3). Estos polisacáridos se usan como vacunas contra N. Meningiditis o E.coli K1 (ver columna 6, líneas 55-59).

Por lo tanto, el documento D1 destruye la novedad de la materia de las reivindicaciones 2, 3, 6-15, 19-23 de la presente solicitud. La materia de las reivindicaciones 4 y 5 parece no involucrar una actividad inventiva.

2. El documento D2 divulga la desacetilación parcial de polisacáridos meningococcales grupo B (GBMP) (ver figura 2). El producto obtenido contiene grupos NH_2 y NHAc . El documento D2 divulga también una N-propionilación parcial de un polisacárido N-desacetilado (ver página 1710, columna izquierda, primer párrafo).

Por lo tanto, el documento D2 destruye la novedad de la materia de las reivindicaciones 1-3, 6-15, 19-23 de la presente solicitud. La materia de las reivindicaciones 4 y 5 parece no involucrar una actividad inventiva.

3. El ejemplo 1 del documento D3 divulga la preparación de un polisacárido meningococal grupo B (MenB PS) derivado al primero desacetilizarlo cuantitativamente, seguido por una N-propionilación parcial (84%). El producto obtenido tiene por lo tanto grupos NH_2 y NHPr .

Por lo tanto, el documento D3 destruye la novedad de la materia de las reivindicaciones 1-3, 6-15, 19-23 de la presente solicitud. La materia de las reivindicaciones 4 y 5 parece no involucrar una actividad inventiva.

4. El documento D6 divulga ácido colomínico N-desacetilado (ver Figura 1), seguido de acilación (ver Figura 2).

Por lo tanto, el documento D6 destruye la novedad de la materia de las reivindicaciones independientes 3, 12, 19, 20 de la presente solicitud.

5. La materia de las reivindicaciones 24-27 de la presente solicitud se considera nueva e inventiva sobre la materia de los documentos D1-D6.

B. Reivindicaciones 16-18

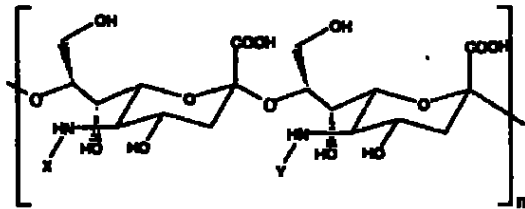
Las reivindicaciones 16-18 conciernen un método para el tratamiento de un humano o animal. Estas reivindicaciones por lo tanto no están de acuerdo con el Artículo 52 EPC.

Además la materia de las reivindicaciones 16-18 parece no ser nueva sobre los documentos D1-D3.

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
Industria y Comercio		DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	
SUPERINTENDENCIA		TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION		MODELO DE UTILIDAD	
PCT		DISEÑO INDUSTRIAL	
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional :			
(71) Solicitante(s) CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT AOKLAND			
(72) Inventor(es) GREGORY R. MOE y DAN M. GRANOFF			
(74) Apoderado: DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO			
(30) Prioridad	(31) N° Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/582.672	23/08/2004	US
(85) Fecha inicio fase nacional:		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 05/01/2006	
Fecha de presentación de la solicitud: 23/08/2005		N° publicación: WO2006/002402	
N° de solicitud PCT/US2005/022590			
(54) Título: DERIVADOS DE POLISACARIDOS Y SUS USOS EN LA INDUCCION DE UNA RESPUESTA INMUNE			

los primero y segundo residuos comprenden grupos amina libres.

Una composición que comprende un derivado de polisacárido (PS) que comprende una estructura representada por la fórmula:



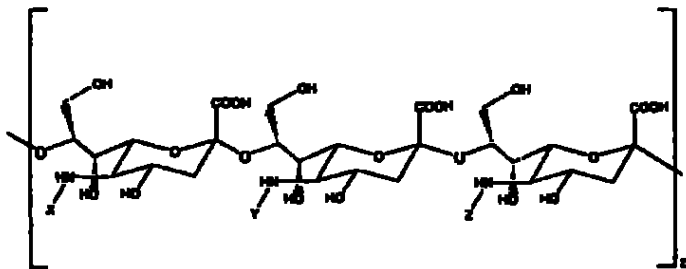
en donde:

X e Y son independientemente H o un grupo acetilo; y

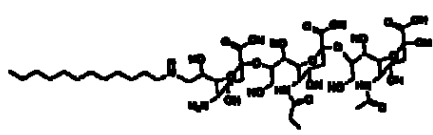
n es cuando menos 1;

en donde el derivado de PS se conjuga con una proteína portadora o además comprende un residuo de ácido siálico que tiene una alquil-amina secundaria en el extremo no reductor del derivado de polisacárido.

Una composición que comprende un derivado de polisacárido (PS) que comprende una estructura representada por la fórmula:



 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	
TARJETA ARCHIVO TEMATICO			
SUPERINTENDENCIA		PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional :			
(71) Solicitante(s) CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND			
(72) Inventor(es) GREGORY R. MOE y DAN M. GRANOFF			
(74) Apoderado: DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO			
(30) Prioridad	(31) N° Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/582.672	23/06/2004	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional:		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 05/01/2006	
Fecha de presentación de la solicitud: 23/06/2005		N° Publicación : WO2006/002402	
N° de solicitud PCT/US2005/022590			
(54) Título: DERIVADOS DE POLISACARIDOS Y SUS USOS EN LA INDUCCION DE UNA RESPUESTA INMUNE			
(57) Resumen: Una composición que comprende un adyuvante y un derivado de polisacárido (PS), comprendiendo el derivado de polisacárido cuando menos un dímero de primero y segundo residuos de un ácido siálico o un derivado de ácido siálico, en donde: el primer residuo está N-acetilado y el segundo residuo comprende un grupo amina libre, el primer residuo comprende un grupo amina libre y el segundo residuo está N-acetilado, o			
CONTINUA AL RESPALDO ...			



en donde X, Y, y Z son independientemente H o un grupo acilo saturado, con la condición de que cuando menos uno de X, Y, y Z es un grupo acilo saturado y n es cuando menos uno;

en donde el derivado de polisacárido se conjuga opcionalmente con una proteína portadora o además comprende un residuo de ácido siálico que tiene una alquil-amina secundaria en el extremo no reductor del derivado de polisacárido.

en donde el derivado de polisacárido se conjuga opcionalmente con una proteína portadora o además comprende un residuo de ácido silícico que tiene una alquil-amina secundaria en el extremo no reductor del derivado de polisacárido.

218

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

FRANCIS, Carol, L.
Bozicevic, Field & Francis LLP
1900 University Avenue, Suite 200
East Palo Alto, CA 94303
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 14 September 2005 (14.09.2005)	
Applicant's or agent's file reference CHOR-009WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2005/022590	International filing date (day/month/year) 23 June 2005 (23.06.2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 23 June 2004 (23.06.2004)
Applicant CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
23 June 2004 (23.06.2004)	60/582,672 ✓	US	12 August 2005 (12.08.2005)

1/27

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Frédéric VIGNE Facsimile No. (41-22) 338.89.95 Telephone No. +41 22 338 8049
---	--

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (January 2004)

CKY2SGNU

219

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-129107- -00000-0000
Fee: 2008-12-26 14:58:31 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYI
Eve: 378 FASENACIONALI
As 411 PRESENTACION Fojos. 218



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

**REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION
DEL TRÁMITE**

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ()	(X)	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	()
- Descripción de la invención	(X)	()
- Dibujos de ser estos pertinentes	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	()

COMPLETA () INCOMPLETA (X)

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

EZQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica del Esquema de Trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma responsable: 4/3/12

Fecha: 26 de Dic. 2006

28

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA

REFERENCIA	Radicación No.	06 129107
	Solicitud internacional	PCT/US2005/022590
	Fecha inicio fase nacional	23/01/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	00001927

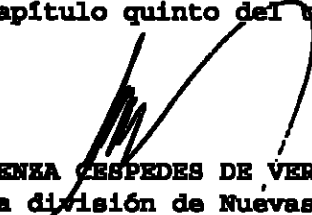
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 FEB. 2007
adpa10