



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 002**

51 Int. Cl.:
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
C07K 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03749887 .0**
86 Fecha de presentación : **07.05.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1501542**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2005**

54 Título: **Vacunas de polisacárido y glucoconjugado mejoradas.**

30 Prioridad: **09.05.2002 WO PCT/IT02/00307**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **BIOSYNTH S.R.L.**
Zona Industriale Loc Sentino
I-53040 Rapolano Terme, IT

72 Inventor/es: **Porro, Massimo**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 293 002 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas de polisacárido y glucoconjugado mejoradas.

5 **Antecedentes**

Las vacunas de glucoconjugados datan su desarrollo industrial para utilización humana después de 1990, basándose en estudios teóricos y modelos moleculares originalmente descritos entre 1929 y 1940. Estos estudios fueron reevaluados y puestos de manifiesto a nivel molecular en la década de 1980 a 1990, aprovechándose de las metodologías más recientes en desarrollo en la era biotecnológica.

La estrategia de utilizar como vacuna un antígeno semisintético que conlleva un carbohidrato unido por enlace covalente a una proteína portadora, ha tenido la base experimental en la demostración de que el sistema inmunitario de lactantes humanos no está completamente maduro hasta los 2 años de edad, de modo que los antígenos de polisacárido muy purificados no son reconocidos de manera eficaz como antígenos extraños por el hospedador humano. Como resultado, una cantidad adecuada de anticuerpo IgG funcional y no anestésico no sigue a la inyección de varias inyecciones de polisacárido. La proteína portadora no desempeña la función de activar propiamente y reforzar la población de linfocitos T cooperadores del sistema inmunitario del hospedador que da como resultado a continuación la expansión de anticuerpos IgG del suero que segregan linfocitos B con memoria específicos para el polisacárido transportado así como para la proteína portadora. El impacto de las vacunas de glucoconjugado en la Salud Pública desde el principio de los noventa, ha sido inapreciable ya que han salvado millones de vidas de niños en situación de riesgo de infecciones agudas mortales, como la meningitis medular debida a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *N. meningitidis*).

Varias estrategias de conjugación química son conocidas para preparar industrialmente un antígeno de conjugado proteína-carbohidrato. Las técnicas conocidas no son satisfactorias en cuanto a rendimientos cuantitativos.

El documento EP 0306607A da a conocer la desintoxicación de LPS por hidrólisis del lípido A que produce polisacárido exento de lípido A. El polisacárido obtenido de este modo y la proteína se activan a continuación y se acoplan para producir vacunas para bacterias Gram-negativas.

Según un aspecto, la presente solicitud se refiere a un procedimiento de preparación que proporciona:

- A) la utilización de antígenos de polisacárido rigurosamente exentos de endotoxina (exentos de LPS), para conjugarse con una proteína portadora, con una pureza mejorada de los antígenos así como para su mejor comportamiento de seguridad;
- B) un rendimiento cuantitativo de cada etapa de reacción implicada en el proceso, que produce a continuación un rendimiento total del antígeno de glucoconjugado cuantitativo con respecto a ambos componentes del conjugado, es decir la proteína portadora y el carbohidrato transportado;
- C) un procedimiento de conjugación flexible. Específicamente, el procedimiento de conjugación permite la síntesis de glucoconjugados como antígenos mono, bi o polivalentes capaces de expresar simultáneamente características inmunógenas mono, bi o polivalentes.

Según un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de purificación y/o conjugación como se describe a continuación en la presente memoria y se reivindica en las reivindicaciones adjuntas. En particular, una forma de realización de la presente invención proporciona un procedimiento de conjugación que implica las etapas siguientes:

- A. activación del antígeno de polisacárido exento de endotoxina contra un polisacárido polifuncional mediante un espaciador de diamino-alquilo introducido mediante:
 - A1. desacoplamiento del O-de-hidrógeno obtenido mediante la introducción de grupos carbonilo reactivos con un agente oxidante para generar grupos aldehído en presencia de iones borato cuando se realiza la reacción en disolvente acuoso; reaccionando a continuación dichos grupos con el espaciador diamino-alquilo en presencia de un agente reductor,
 - A2. enlace del espaciador diamino-alquilo con los restos carbonilo reactivos ya presentes en forma de grupos carboxilo por carbodiimida insoluble en agua, en presencia de disolventes orgánicos,
- B. activación de la proteína inmunógena portadora por el éster bis-succinimidílico de un ácido bicarboxílico alifático, que produce una proteína polifuncional mediante los ésteres de monosuccinimidilo de los restos de lisina,
 - C1. acoplamiento de la proteína portadora polifuncional activada con el polisacárido activado polifuncional exento de endotoxina, mediante los ésteres monosuccinimidílicos introducidos en los restos de lisina de la proteína y los grupos amino introducidos en el polisacárido; o, alternativamente,

ES 2 293 002 T3

- C2. acoplamiento del polisacárido aminoactivado polifuncional a la proteína portadora mediante un éster bis-succinimidílico de un ácido bicarboxílico alifático que reacciona sucesivamente, en la misma mezcla de reacción, con los grupos amino del polisacárido amino-activado y con los grupos epsilon-amino de los restos de lisina de la proteína.

5 Preferentemente los antígenos de polisacárido se purifican mediante un procedimiento que implica la eliminación de la endotoxina contaminante mediante el enlace por afinidad de la fracción lípido A de LPS con los péptidos anti-endotoxina sintéticos (SAEP) con secuencias de aminoácido retroinvertidas, que producen un polisacárido que tiene un contenido de endotoxina convenientemente inferior a 0,125 unidades de endotoxina/ μg de polisacárido, equivalente a menos de 0,00125% (p/p), citado en las reivindicaciones como polisacárido exento de endotoxina.

Procedimiento preferido para preparar vacunas de glucoconjugado

15 **Etapa 1 preliminar: Purificación del antígeno del polisacárido procedente de LPS contaminante**

20 Esta etapa produce un antígeno de polisacárido de pureza excepcionalmente elevada, que impide la posibilidad real de conjugarse con la proteína portadora, además de con el polisacárido, el LPS contaminante. De hecho, las preparaciones utilizadas actualmente de polisacáridos que se originan a partir de la cápsula de las bacterias Gram-negativas, pueden contener una cantidad de LPS igual o inferior a 25 UE/ μg de polisacárido (unidades de endotoxina/mCg). Este límite es requerido por las Farmacopeas Oficiales que emiten las especificaciones del producto. Dado que 1 UE/ml detectada por el análisis del LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) iguala a una media de 100 pg/ml de LPS purificada, en 1 μg de antígeno de polisacárido existe una cantidad de LPS contaminante de 2,5 ng. Dado el hecho de que la dosis inmunizante para personas está comprendida en el intervalo entre 25 y 50 μg para el polisacárido capsular purificado y entre 10 a 25 μg para el polisacárido capsular conjugado, se puede calcular que el hospedador está recibiendo entre 62,5 y 125 ng de LPS/dosis de polisacárido capsular en la vacuna anterior y entre 25 y 62,5 ng de LPS/dosis de polisacárido conjugado en la vacuna última.

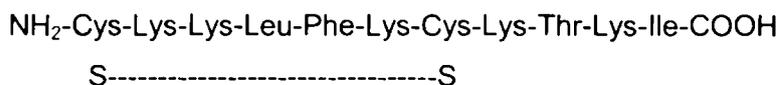
35 Estas concentraciones de impurezas de LPS presentes en los productos disponibles en el mercado, cuando se expresan en peso para lactantes y niños (de 4 a 8 kg de peso corporal medio entre los 3 y 24 meses de edad) que son las poblaciones destinatarias de las vacunas glucoconjugadas, corresponden y superan el umbral de pirogenicidad determinado recientemente para LPS en personas (concentraciones de suero entre 1 y 2 ng de LPS/kg de peso corporal después de la administración i.v.). La inyección de una dosis de 25 a 50 μg de vacuna de polisacárido, que contiene entre 62,5 y 125 ng de LPS contaminante, introduce realmente en el hospedador humano del lactante una cantidad de LPS contaminante comprendida en el intervalo entre 15 y 30 ng/kg. En el caso de un glucoconjugado, estas cifras se calculan en el intervalo entre 6 y 15 ng/kg.

45 Esta observación explica la razón de por qué se describen efectos pirógenos, esporádicos, aunque detectables, después de la inmunización con vacunas de polisacárido capsular (en forma de polisacárido libre o polisacárido conjugado), aunque los efectos secundarios generales de las vacunas estén mitigados por las vías de administración s.c. e i.m.

50 La purificación completa de un polisacárido capsular para ser utilizado en la preparación de una vacuna conjugada, se da a conocer en la presente solicitud preferentemente por eliminación de la afinidad del LPS contenido en la preparación de polisacárido utilizando un soporte sólido (membrana filtrante o esferas de vidrio o medio cromatográfico en gel) al que se unen por enlace covalente los péptidos de antiendotoxina sintéticos dados a conocer en la patente US nº 5.589.459 (concedida el 31 de diciembre de 1996).

Procedimiento preferido

55 SAEP3-RIS, como ejemplo, es un péptido cíclico con la secuencia de aminoácidos retroinvertida:



65 que hace que el péptido sea resistente a la actividad de las serina proteasas durante el proceso de purificación. SAEP3 está unido por enlace covalente a una membrana filtrante que lleva un grupo amino por un procedimiento conocido que puede incluir el éster bis-succinimidílico del ácido adípico del espaciador bifuncional.

En un experimento típico, una membrana filtrante activada por SAEP3-RIS (poros de 0,45 μm y una densidad de 51,6 nmoles de SAEP3/cm² de membrana) se utiliza como herramienta para eliminar los LPS de la solución de polisacárido del Grupo A (PsA) de *N. meningitidis* (100 mg/ml) en PBS pH = 7,20. La cantidad eliminada de LPS después del ciclo de filtración excede de 2,0 logs con respecto a la cantidad contenida en el material de partida (25 UE LPS/ μg de PsA antes de la filtración por afinidad en comparación con inferior a 0,125 UE LPS (el nivel de sensibilidad de la prueba de coagulación de LAL)/ μg PsA después de la filtración por afinidad, equivalente a inferior a 0,00125% expresado en peso. De este modo, incluso si se utiliza polisacárido filtrado por afinidad a la dosis humana máxima administrable de 25 μg como Ps conjugada o 50 μg de Ps pura, *no puede alcanzar* el umbral de pirogenicidad expresado en peso a medida que la concentración de endotoxina existente disminuye entre 0,06 y 0,15 ng/kg, respectivamente, en lactantes y niños de 4 a 8 kg de peso corporal medio. A este nivel de pureza, la vacuna de polisacárido o glucoconjugado no produce pirógenos incluso si se inyectara por vía intravenosa.

Una PsA filtrada por afinidad presenta, por consiguiente, un perfil más seguro con respecto a los polisacáridos recomendados actualmente para la vacunación como Ps libre o Ps conjugada que, aunque purificada en grandes concentraciones, conserva todavía una cantidad no despreciable de LPS contaminante.

Etapa 2: Introducción estratégica y cuantitativa de grupos aminorreactivos en restos de carbohidrato seleccionados dentro de una estructura de polisacárido que presenta grupos carbonilo reactivos en forma de grupos aldehído introducidos "ad hoc" o grupos carbonilo ya presentes

Exposición razonada

Las estructuras de polisacárido que presentan grupos amino no potencialmente reactivos para ser utilizadas para estrategias de conjugación directa con un portador de proteína dado, deben activarse previamente mediante reacciones químicas. Es bien sabido en química orgánica clásica que los grupos hidroxilo adyacentes presentes en estructuras de mono o polisacárido pueden activarse con grupos aldehído reactivos, mediante la utilización de reactivos oxidantes como peryodato sódico en presencia de un agente reductor que estabiliza la base de Schiff formada (reacción clásica conocida por los químicos como "aminación reductora"). En los procedimientos patentados anteriores, esta reacción se ha utilizado para conjugar *directamente* una Ps oxidada con peryodato con una proteína portadora dada (Jennings 1980 y Anderson, 1982). El límite de este procedimiento es que el rendimiento de la reacción está penalizado por el impedimento estérico de dos moléculas grandes que deben interactuar, que es la Ps y la Proteína.

Según una forma de realización del presente procedimiento se utiliza la reacción de "aminación reductora" clásica para activar selectivamente la estructura Ps en "zonas seleccionadas", introduciendo un grupo amino reactivo que preferentemente está espaciado del carbohidrato mediante un espaciador alquilo (alquil diamina) necesario solo para derivar el fenómeno del impedimento estérico que se produce en la etapa de conjugación siguiente. Esta estrategia consigue de manera cuantitativa la activación de la estructura Ps. Las "zonas seleccionadas" de la estructura Ps están convenientemente representadas por los restos oxidrilo, exentos de O-acetilo, adyacentes forzados a asumir la conformación en *cis* mediante la presencia de iones boro que forman complejos solamente con el OH en *cis* adyacente y no con el OH en *trans*. De tal manera, la reacción oxidativa y la reducción consiguiente de la base de Schiff formada, que conduce a la introducción de grupos amino reactivos en las zonas seleccionadas de la estructura Ps, tendrá lugar preferentemente en las posiciones OH en *cis* de la estructura de Ps.

Una estrategia alternativa de lo anteriormente descrito, para introducir grupos aldehído adyacentes en un polisacárido que presenta grupos OH adyacentes, comprende convenientemente la reacción del antígeno de polisacárido con el reactivo tetraacetato de plomo. En este caso, el disolvente acuoso se sustituye por un disolvente orgánico.

Según otra forma de realización, en los casos en que las posiciones OH próximas están presentes en la naturaleza como derivados de éster de grupos acetilo (grupos O-acetilo), la des-O-acetilación puede conseguirse de manera selectiva y cuantitativa por hidrólisis con hidrazina anhidra. A continuación, sigue la activación de los grupos O-desacetilados adyacentes según el procedimiento descrito anteriormente.

Según otra forma de realización, en los casos en los que los grupos carbonilo están ya presentes en la estructura de polisacárido, en forma de grupos carbonilo, la transformación de los grupos amino reactivos se realiza mediante la utilización de la diamina espaciada por alquilo mencionada anteriormente, por reacción con carbodiimida (DCC o EDAC) en un disolvente apropiado.

En los procedimientos de activación para un antígeno de carbohidrato, es importante que no haya concentraciones contaminantes significativas de endotoxina (lipopolisacárido, LPS) con objeto de impedir la reacción paralela de activación de la cadena de carbohidrato de esta molécula y a continuación conjugarla con la proteína portadora, con

ES 2 293 002 T3

el resultado obvio de tener un antígeno conjugado polisacárido-proteína que está asociado a los efectos tóxicos que presenta el conjugado LPS-proteína en el momento de la inyección en el hospedador humano.

5 A título de ejemplo se ilustran los procedimientos preferidos para introducir en grupos carbonilo con estructura de polisacárido en forma de restos de aldehído para ser transformados a continuación en grupos amino reactivos.

Escisión oxidativa

10 En un ejemplo típico de activación de una estructura de polisacárido mediante grupos amino primarios, PsA (un homopolímero de 1,6 fosfato de N,O-acetil manosamina purificada procedente de grupos A de *N. meningitidis*, que ha sido utilizada como tal o ha sido parcialmente des-O-acetilada previamente con la cantidad estequiométrica deseada de hidrazina anhidra en tetrahidrofurano durante 5 a 120 minutos a 37°C, a continuación ha sido recuperada por precipitación con acetona anhidra y lavada tres veces) se hace reaccionar con uno u otro de los reactivos siguientes:

15 Reactivo A

Peryodato sódico en una cantidad por lo menos equimolar con el 0,5 a 5% de monosacáridos que presenta grupos -OH vecinos, estimada en la estructura PsA por análisis RMN (Resonancia Magnética Nuclear).

20 En la PsA natural existe una cantidad experimentalmente estimada de grupos -OH adyacentes que llevan monosacárido comprendidos entre 10 y 30% de los restos de monosacárido total.

25 La reacción se lleva a cabo de manera conveniente en presencia de tampón borato 0,25 a 0,50 M, pH = 8,20, 15 a 30 minutos a 4°C. Esta reacción produce de manera ventajosa la activación cuantitativa (100%) a grupos aldehído del 0,5 al 5% de los restos de monosacáridos que presentan grupos -OH adyacentes, que están presentes en la estructura de PsA; o:

Reactivo B

30 Tetraacetato de plomo en las mismas condiciones descritas anteriormente, excepto que la reacción se realiza en disolvente orgánico en lugar de tampón (p. ej.: sulfóxido de dimetilo o dimetilformamida). En este caso, la Ps activada por aldehído insoluble se recupera por centrifugación a baja g y se lava tres veces con acetona.

Aminación reductora

35 Tras la selección de una de las dos etapas anteriores, se realiza la adición del espaciador bifuncional (1,4 di-amino)-n-butano, (como ejemplo entre una variedad de bis-alquil amina tal como 1,2-etilamina, 1,3-propilamina, 1,4 butilamina), a un exceso molar de cinco a diez veces la cantidad de grupos -CHO reductores introducidos en la estructura de PsA por oxidación selectiva. El complejo piridina borano, necesario para reducir de manera eficaz y por consiguiente estabilizar la base de Schiff formada, se añade típicamente en una cantidad molar dos a cinco veces mayor con respecto al 1,4-diamino-butano utilizado en la reacción; la mezcla se mantiene convenientemente en agitación magnética durante 18 horas (durante la noche) a 4°C, pH = 8,20 en tampón de borato 0,25 a 0,50 M. Por último, se añade borohidruro sódico (la misma cantidad molar del complejo piridina-borano) a la mezcla de reacción, durante 1 hora. La reacción oxidativa y la aminación reductora pueden realizarse como un procedimiento de una sola etapa.

45 El rendimiento de la reacción es cuantitativo (100%) con respecto al 0,5 al 5% de los restos de monosacárido que presentan grupos -OH vecinos, que están presentes en la estructura de PsA. En este punto del procedimiento, por consiguiente, la PsA presenta una estructura multipunto, activada por el grupo amino primario. Dado un PM medio de $2,5 \times 10^5$ para PsA, referido al tamizado molecular seguido por espectrometría MALDI-TOF o cualquier otro procedimiento para la determinación de masas, PsA contendría aproximadamente 1.000 restos de monosacárido de 1,6-fosfato de N-acetil-manosamina.

55 Dependiendo del intervalo de estequiometría anterior utilizado en la reacción, un número medio de 5 a 50 restos de monosacáridos resulta activado por el grupo amino primario "espaciado ad hoc", en una media de 1.000 restos de monosacárido. El polisacárido activado por amino se purifica en reactivos de bajo peso molecular por diafiltración utilizando una membrana con NMWL de 10^4 y tampón borato 0,25 M, pH 8,20 o por cromatografía de permeación en gel utilizando Sepharose G-50. Este producto intermedio puede liofilizarse y almacenarse a -20°C o inferior.

60 El mismo solicitante ha dado a conocer en la patente US nº 5.306.492 anterior concedida el 26 de abril de 1994 la activación de polisacáridos de *S. pneumoniae* mediante su *único* resto de monosacárido que reduce el extremo. En este caso, la reacción de aminación reductora se consiguió a un rendimiento significativo "desplazando" el equilibrio de la forma de acetal (anillo cerrado) del resto de monosacárido que reduce el extremo (R'-CHOH) con la forma de cadena abierta R'-CHO (semiacetal), utilizando temperatura elevada (100°C). Esta reacción produjo oligosacáridos activados por el grupo amino primarios *en un extremo* útil para acoplarse a una proteína portadora. Según esta estrategia, 65 el modelo glucoconjugado conseguido fue el correspondiente al oligosacárido de un extremo, unido por enlace covalente, sin ninguna posibilidad de reticulación (puntos múltiples de enlace covalente) entre el oligosacárido y la proteína portadora.

ES 2 293 002 T3

Procedimiento ejemplar para introducir grupos amino reactivos en una estructura de polisacárido que contiene grupos carbonilo en forma de restos carbonilo:

Los polisacáridos que presentan en su estructuras grupos carbonilo en forma de restos carbonilo (p. ej.: la Ps capsular de *S. typhi*, conocida como antígeno Vi, que es un homopolímero del ácido N,O-acetil galacturónico) se activan con los grupos amino reactivos de la forma siguiente: el polisacárido Vi se disuelve en DMSO (otros polisacáridos pueden solubilizarse también en DMF o dioxano dependiendo de su estructura) y se añade al espaciador bifuncional 1,4-diamino-n-butano (como ejemplo) en cantidad estequiométrica con el 0,5 a 5% del -COOH presente en la estructura de polisacárido. El reactivo DCC (diciclohexil carbodiimida) insoluble en agua se añade en una cantidad por lo menos equimolar con el espaciador bifuncional. La mezcla de reacción se realiza de 2 a 4 horas a 37°C. Durante la reacción, se forma un mol de diciclohexilurea insoluble por mol de resto de monosacárido activado por el grupo amino que lleva originalmente un resto -COOH. Dado que la reacción es cuantitativa con respecto al 0,5 a 5% de los restos de monosacárido que llevan restos -COOH, la misma cantidad cuantitativa se transformará en grupos amino reactivos espaciados. Después de descargar la diciclohexilurea insoluble, el polisacárido Vi activado por amino se purifica a continuación a partir de los reactivos de bajo peso molecular mediante la precipitación con Et-OH del 50 al 75% (v/v) o se dializa por filtración a través de una membrana filtrante con NMWL de 10⁴, tras la dilución con PBS 0,1 M pH = 7,20.

Etapa 3: Activación de los grupos epsilon-amino de los restos de lisina de la proteína portadora para derivados reactivos de mono-succinimidilo

Exposición razonada

Una activación apropiada de la proteína portadora para la reacción de acoplamiento final con el polisacárido activado, es una estrategia que permite el aumento significativo del rendimiento de esta reacción. La principal razón para esta observación experimental es que una molécula espaciadora pequeña y muy reactiva puede derivar eficazmente el fenómeno del impedimento estérico que ocurre cuando dos moléculas grandes (polisacárido y proteína) se llegan a poner en contacto muy íntimo para reaccionar para formar un enlace covalente. En el caso específico de esta solicitud, se utiliza un éster bis-succinimidílico obtenido mediante un ácido bicarboxílico como el 1,3-carboxil propiónico, 1,4-carboxil butanoico, 1,5-carboxil pentanoico y 1,6-carboxil hexanoico.

Procedimiento preferido

Se solubiliza la vacuna antitetánica de la proteína inmunógena, como ejemplo, en la mezcla sulfóxido de dimetilo (DMSO): tampón PBS (o acetato) 0,1 M pH = 7,2 (50:50 v/v) a la concentración de 10 mg/ml o más. La cantidad de grupos epsilon amino reactivos de los restos de lisina presentes en la proteína se estima mediante un procedimiento químico convencional (p. ej.: reactividad al reactivo TNBS) o una alícuota de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se añade a continuación del espaciador bifuncional éster bis-succinimidílico del ácido adípico (ácido 1,6-carboxil hexanoico) en cantidad molar equivalente con respecto a la cantidad de grupos amino estimados por mol de PsA activada que debe conjugarse. La reacción se deja 1 hora a 37°C. El producto de reacción es el derivado monosuccinimidílico de la vacuna antitetánica que presenta la transformación cuantitativa de los grupos epsilon amino de los restos de lisina en ésteres monosuccinimidílicos muy reactivos del ácido adípico. En estas condiciones, no se produce ninguna reticulación proteína-proteína, ya que el equilibrio entre las características próticas/polares del disolvente es crucial para favorecer la reacción del derivado frente a la reacción de reticulación. La Proteína activada está lista entonces para el acoplamiento inmediato a la PsA activada ya que la estabilidad de este compuesto intermedio dura no más de 30 a 60 minutos, para una recuperación cuantitativa de ésta.

Etapa 4: Acoplamiento de la Proteína activada al Polisacárido activado

Exposición razonada

De manera conveniente, el Polisacárido activado por el grupo espaciador (en los ejemplos dados anteriormente PsA o PsVi) se hace reaccionar con la Proteína activada por el espaciador éster succinimidílico. En este caso, la naturaleza nucleófila del reactivo activado anterior estará complementada químicamente por el grupo éster lábil y electrofílico del último reactivo. El producto formado es un conjugado reticulado de polisacárido-proteína de alto PM. La reacción puede llevarse a cabo también simultáneamente con Polisacáridos heterólogos activados para que se conjuguen con la *misma* Proteína portadora (p. ej.: tanto PsA como PsVi). Las condiciones de reacción continúan siendo las mismas. En dicho caso se sintetiza una formulación de vacuna polivalente, que utiliza una única proteína portadora para transportar varios antígenos del Polisacárido capsular diferentes (p. ej.: *Haemophilus influenzae* tipo b; *Neisseria meningitidis* Grupo A, C, Y, W135; *Streptococcus pneumoniae* tipo 4, 6A y 6B, 9N, 14, 18c, 19F, 23F; *S. typhi* Vi; *K. pneumoniae* etc.).

ES 2 293 002 T3

Además, la misma estrategia y las mismas condiciones pueden aplicarse a la conjugación de moléculas de carbohidrato que presentan su estructura molecular, grupos amino primarios relacionados con la presencia de un azúcar N-amino no sustituido (p. ej.: glucosamina o manosamina o galactosamina en lugar de N-acetil glucosamina o N-acetil manosamina o N-acetil galactosamina, etc.) así como a la presencia de restos de etanolamina. Este es el caso del lipopolisacárido (LPS o endotoxina) que, en las formas desintoxicadas como LPS lípido A-de-O-acilado o LPS desprovisto de lípido A o complejo LPS-péptido sintético anti endotoxina pueden utilizarse como entidad inmunógena después de la conjugación con una proteína portadora seleccionada.

Forma de realización del procedimiento

Una solución orgánica acuosa que contiene la vacuna antitetánica activada por el éster monosuccinimidílico se mezcla con la solución orgánica acuosa que contiene la PsA activada por amino. La solución final está compuesta por DMSO: tampón PBS (o acetato) 0,1 M pH = 7,2 (50:50 v/v). La composición molar de los reactivos es tal que existe equimolaridad entre la cantidad total de grupos éster mono-succinimidílicos presentes en la vacuna antitetánica y la cantidad total de grupos amino presentes en la PsA (o la cantidad total de grupos amino presentes en los polisacáridos múltiples y heterólogos como PsA y PsVi). La reacción tiene lugar 2 a 4 horas a 4°C, con un rendimiento que es cuantitativo para ambos (o múltiples) reactivos.

El antígeno conjugado HMW se recupera a continuación por precipitación con Et-OH del 25 al 50% (v/v) o por tamizado molecular a través de una columna Sepharose-6B. En este último caso, el conjugado HMW se recupera cuantitativamente (100%) en el volumen vacío de la columna mientras que el disolvente residual (DMSO) presente en la mezcla se conserva en el Vi de la columna y a continuación se descarta.

Alternativamente, la purificación del conjugado del disolvente (DMSO) puede llevarse a cabo por diálisis mediante filtración utilizando una membrana filtrante con NMWL de 10⁴.

Procedimiento alternativo de acoplamiento, que combina las etapas 3 y 4 para llevar a cabo la reacción de conjugación en una sola etapa.

Exposición razonada

El control minucioso del equilibrio entre la polaridad y las características protónicas del disolvente utilizando como medio de reacción, permite la posibilidad de “conducir” con eficacia la reacción de acoplamiento entre el polisacárido activado por el enlazador amino y la Proteína portadora mediante un enlazador bifuncional como los ésteres bis-succinimidílicos de un ácido bicarboxílico. En particular, un grupo éster es estable durante varias horas en un disolvente polar y no prótico como DMSO mientras que se hidroliza rápidamente en presencia de un disolvente polar y prótico como el agua. Dado que la solubilidad y la retención de antigenicidad de los Polisacáridos y varias Proteínas en una mezcla apropiada de DMSO/agua no representa ningún problema, la selección de un sistema disolvente bien equilibrado se hace crucial para una termodinámica eficaz de la reacción de acoplamiento. En condiciones oportunas de estabilidad del reactivo éster bifuncional y para varios antígenos de polisacárido y proteína es entonces posible conseguir el acoplamiento de las dos entidades moleculares (Polisacárido y Proteína) en una sola etapa.

Procedimiento a título de ejemplo

El Polisacárido activado por el enlazador amino se solubiliza a 4°C en DMSO/tampón acetato 0,1 M pH = 7,0 (75%:25% v/v) a la concentración de 5 a 10 mg/ml y se añade al éster bis-succinimidílico del espaciador bifuncional del ácido adípico (como ejemplo) en una cantidad comparable a la requerida estequiométricamente por la cantidad molar total de grupos amino presentes en su estructura (p. ej.: determinada por la reacción con TNBS). La proteína portadora, previamente disuelta a 4°C en DMSO/tampón acetato 0,1 M pH = 7,0 (50% : 50% v/v) a la concentración de 5 a 10 mg/ml, se añade a continuación a la mezcla de reacción en un espacio de tiempo de 15 a 60 minutos a partir de la adición del espaciador bifuncional. La cantidad total de Polisacárido activado por el enlazador y la cantidad total de la proteína portadora presente en la mezcla de reacción están comprendidas en un intervalo de la relación (p/p) entre 1:1 y 1:5 y aún superior, dependiendo del PM de los dos reactivos y de la cantidad de grupos amino por mol de cada uno de los reactivos. La reacción se mantiene a 4°C, en agitación suave, durante 4 a 6 horas adicionales. El producto glucoconjugado se recupera cuantitativamente (100% para ambos componentes) según el procedimiento descrito en la Etapa 4 anterior, con objeto de eliminar los compuestos LMW presentes en la reacción, es decir la N-hidroxi-succinimida liberada durante la reacción de los grupos éster con los grupos amino, el disolvente DMSO y los iones acetato.

Estabilidad y almacenaje de las vacunas de glucoconjugado preparadas según una forma de realización del procedimiento de la invención

ES 2 293 002 T3

El enlazador resultante interpuesto entre la proteína y los antígenos del polisacárido contiene dos enlaces amídicos y un enlace imina reducido. El enlace anterior se encuentra en las proteínas naturales y puede escindirse solamente en condiciones duras como temperatura superior a 100°C en presencia de HCl 3 M. Este último es resistente incluso en condiciones severas en las que se escinde el anterior. Por consiguiente, el glucoconjugado preparado según el procedimiento anterior resulta ser un producto muy estable. Por encima de todo, el procedimiento de glucosilación también produce una proteína portadora más estable para la proteólisis por las serina proteasas como tripsina y quimiotripsina. Sin embargo, dado que la estabilidad de un glucoconjugado se refiere también a la estructura de polisacárido como tal, una estructura Ps dada puede presentar diferentes requisitos para el almacenaje a largo plazo de otras estructuras. Por esta razón, se recomienda el almacenaje de un producto similar de cualquier modo como forma liofilizada a -20°C o inferior, en presencia de un soporte inerte (p. ej.: lactosa o manitol, 5% p/v).

Resultados obtenidos con una forma de realización del procedimiento de conjugación físico-química

El conjugado resultante del procedimiento descrito es una entidad reticulada, polidispersa y de alto peso molecular que eluye de un tamizador molecular como Sepharose 2B-CL con una curva de forma monomodal o bimodal en el intervalo de $K_d = 0,1-0,8$. Las características de elución prueban que la entidad del conjugado es un sistema polidisperso desde el punto de vista del peso molecular. El conjugado purificado presenta una relación molar media Proteína : Polisacárido en el intervalo entre 0,75 y 1,25 (mol/mol). Sin embargo, esta relación puede variar considerablemente (en el intervalo 0,5 a 2,0 mol/mol o superior) dependiendo del PM de la Proteína y del Polisacárido utilizados en la reacción de conjugación. Transferido a bases en peso, el valor de esta relación puede oscilar de manera significativa según el PM de los componentes en el conjugado. En los ejemplos dados anteriormente utilizando PsA y vacuna antitetánica según la estequiometría de la reacción descrita, la media de la relación (p/p) Proteína: Polisacárido puede ser tan alta como 3 con un valor SD que disminuye dentro del 25% del valor.

Pirogenicidad

Dicho conjugado contiene menos de 0,125 UE/ μg de producto (o menos de 12,5 pg de LPS)/ μg de conjugado, que corresponde a menos de 0,00125% p/p) cuando se ensaya por coagulación de LAL.

Rendimiento de la reacción

El rendimiento total del proceso completo es cuantitativo referido a ambos componentes del conjugado.

Eficacia de la reacción de conjugación

La reacción de síntesis es muy flexible, porque una de las dos vacunas de glucoconjugado monovalente o polivalente puede prepararse en la misma etapa de conjugación. Una lista de vacunas polivalentes que puede prepararse mediante la presente invención incluye, pero no se limita a las siguientes:

una vacuna de glucoconjugado del grupo A, C, W135, Y, meningocócica tetravalente preparada por acoplamiento de cada polisacárido activado por amino por separado a la misma proteína portadora.

una vacuna de glucoconjugado del grupo 4, 6, 9, 14, 18, 19, 23, neumocócica polivalente preparada por acoplamiento de cada polisacárido activado por amino por separado a la misma proteína portadora.

una vacuna de glucoconjugado, meningocócica y neumocócica polivalentes preparada por acoplamiento de cada polisacárido activado por amino por separado a la misma proteína portadora.

Inmunogenicidad en ratones

Como ejemplo para demostrar la inmunogenicidad de un glucoconjugado sintetizado con el nuevo procedimiento industrial, se inmunizaron grupos de ratones Swiss Webster de 8 semanas de vida por vía subcutánea, intramuscular o intraperitoneal con tres dosis de la vacuna de glucoconjugado TT-PsA en el intervalo de dosis de 1 a 10 μg /ratón, dos semanas aparte (semana 0, 2 y 4). Dos semanas después de cada inyección (semana 0, 2, 4 y 6), se extrajo sangre a los ratones y se analizaron los sueros por ELISA con objeto de cuantificar la concentración de anticuerpo IgG con isótopo producida de manera específica contra el polisacárido A transportado y la proteína portadora TT.

ES 2 293 002 T3

La tabla 1 siguiente presenta los títulos de anticuerpo obtenidos:

TABLA 1

*Títulos por ELISA de IgG producidos por glucoconjugado de sueros de ratones SW * sin adyuvante mineral, nd funcionalidad biológica relativa*

Dosis de PsA como conjugado** (vía: s.c.)	Semana 0		Semana 2		Semana 6	
	TT	PsA	TT	PsA	TT	PsA
1 µg/ratón	<200	<200	3.000	1.000	42.500	5.500
	(<0.1)	(<10)	(0,5)	(32)	(5,0)	(128)
5 µg/ratón	<200	<200	7.200	4.500	136.900	25.000
			(1)	(128)	(>10)	(1,204)
10 µg/ratón	<200	<200	9.600	5.800	138.500	26.500
			(>1)	(128)	(>10)	(2,048)

* Los títulos se expresan como media de la dilución recíproca (punto final) del grupo de sueros de grupos de cinco ratones cada uno, de tres experimentos diferentes. La SD de los títulos medios está comprendida dentro del 20% de los valores indicados. La funcionalidad biológica de los anticuerpos está indicada entre paréntesis y se refiere a la actividad bactericida dependiente del complemento (PsA) así como a la actividad neutralizante de la vacuna contra el tétanos. La PsA inyectada como referencia en el intervalo de dosis 5 a 10 µg/ratón, no produjo ninguna cantidad significativa de anticuerpos IgG específicos para PsA (títulos de punto final < 200).

** La dosis de conjugado contiene los dos componentes en la misma cantidad (2,5 µg de cada uno) ya que su relación en peso es 1,0.

Como ejemplo adicional de inmunización, se inyectó a grupos de ratones comparables otra preparación de glucoconjugado TT-PsA, utilizando un adyuvante mineral AlPO₄:

TABLA 2

*Títulos por ELISA de IgG producidos por el glucoconjugado de sueros de ratones SW *, utilizando el adyuvante mineral AlPO₄*

Dosis de PsA como conjugado** (vía: i.p.)	Semana 0		Semana 2		Semana 6	
	TT	PsA	TT	PsA	TT	PsA
5 µg/ratón	<200	<100	800	1,000	51,200	409,500
10 µg/ratón	<200	<100	3,200	1,600	51,200	204,800

* Títulos de ELISA expresados como en la Tabla 1. La PsA inyectada como referencia a la misma dosis no produjo títulos significativos de anticuerpos IgG específicos para PsA (títulos de punto final <200)

** La dosis de conjugado contiene los dos componentes en la relación w/w Proteína : Polisacárido = 3,0

Dosis preferida y formulación de vacunas de polisacárido y glucoconjugado

La dosis de polisacárido en la forma de vacunas de glucoconjugado preparadas según el procedimiento de conjugación descrito, puede oscilar preferentemente entre 0,5 y 10 µg o más en lactantes y niños y hasta 25 ó 50 µg o más en adultos, cuando se desea la vacuna para la protección frente a un antígeno Ps transportado (formulación monovalente). En los casos de formulaciones polivalentes, es decir cuando se transportan antígenos Ps múltiples por la misma proteína portadora o están asociados como glucoconjugados heterólogos monovalentes; la dosis puede aumentarse de acuerdo con la composición de amplio espectro de la vacuna, teniendo en consideración el intervalo de dosis indicado anteriormente. Los expertos en materia de experimentación clínica pueden encontrar propiamente la dosis de inmunización óptima.

ES 2 293 002 T3

De manera conveniente, la dosis de vacunas de polisacárido purificadas según el procedimiento descrito puede oscilar entre 5 y 50 μg en niños. Las mismas consideraciones anteriores indicadas para las formulaciones polivalentes de glucoconjugados pueden aplicarse a las vacunas de polisacárido. Dado que los lactantes no responden de manera adecuada a los antígenos de polisacárido, éstos pueden utilizarse para reforzar la inmunización después que se ha
5 llevado a cabo la inmunización básica utilizando vacunas de glucoconjugado. Asimismo, ya sea las formulaciones monovalentes o las polivalentes de vacunas de polisacárido y glucoconjugado pueden estar asociadas a otras vacunas pediátricas disponibles en el mercado con o sin la presencia de adyuvantes minerales que pueden contribuir a la inmunogenicidad de la formulación completa.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de conjugación que implica las etapas siguientes:

5 A. activación de un antígeno de polisacárido exento de endotoxina contra un polisacárido polifuncional mediante un espaciador de diamino-alquilo introducido mediante:

10 A1. desacoplamiento del O-de-hidrógeno obtenido mediante la introducción de grupos carbonilo reactivos con un agente oxidante para generar grupos aldehído en presencia de iones borato cuando se realiza la reacción en disolvente acuoso; reaccionando a continuación dichos grupos con el espaciador diamino-alquilo en presencia de un agente reductor, o mediante

15 A2. enlace del espaciador diamino-alquilo con los restos carbonilo reactivos ya presentes en forma de grupos carboxilo por carbodiimida insoluble en agua, en presencia de disolventes orgánicos,

B. activación de la proteína portadora inmunógena por el éster bis-succinimidílico de un ácido bicarboxílico alifático, que produce una proteína polifuncional mediante los ésteres bis-succinimidílicos de los restos de lisina,

20 C. acoplamiento de la proteína portadora polifuncional activada con el polisacárido polifuncional exento de endotoxina activada, mediante los ésteres bis-succinimidílicos de los restos de lisina de la proteína y los grupos amino del polisacárido

25 2. Procedimiento de conjugación según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno del polisacárido exento de endotoxina se prepara mediante la eliminación de la endotoxina contaminante mediante el enlace por afinidad de la fracción lípido A de LPS con péptidos anti-endotoxina sintéticos (SAEP) que presentan secuencias de aminoácido retroinvertidas.

30 3. Vacuna que contiene uno o más antígenos de glucoconjugado preparados según la reivindicación 1, que se administra por vía s.c., i.m. o i.d. en la dosis comprendida entre 0,1 y 100 μ g, en una sola o múltiples inyecciones.

4. Formulación para vacuna que contiene uno o más antígenos de glucoconjugado preparados según la reivindicación 1.

35 5. Procedimiento para preparar un antígeno de polisacárido exento de endotoxina (LPS) conjugado con una proteína portadora que comprende las etapas siguientes:

40 A. activación del antígeno de polisacárido exento de endotoxina (exento de PLS) mediante la introducción de grupos amino reactivos,

B. activación de la proteína portadora inmunógena,

45 C. acoplamiento de la proteína portadora activada con el polisacárido activado polifuncional exento de endotoxina.

50 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha etapa A comprende el desacoplamiento O-de-hidrógeno mediante la introducción de grupos carbonilo reactivos con un agente oxidante para generar grupos aldehído en presencia de iones borato, reaccionando a continuación dichos grupos con un espaciador diamino-alquilo en presencia de un agente reductor.

7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha etapa A comprende un enlace del espaciador diamino-alquilo con los restos carbonilo reactivos en forma de grupos carboxilo por carbodiimida insoluble en agua, en presencia de un disolvente orgánico.

55 8. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la activación de la proteína inmunógena portadora de la etapa B es llevada a cabo mediante los ésteres monosuccinimidílicos de los restos de lisina de la proteína.

60 9. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el acoplamiento de la etapa C se lleva a cabo mediante los ésteres monosuccinimidílicos de los restos de lisina de la proteína y los grupos amino del polisacárido.

10. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el acoplamiento de la etapa C se lleva a cabo mediante un éster bis-succinimidílico de un ácido bicarboxílico alifático que reacciona sucesivamente con 1) un grupo amino del polisacárido amino-activado y 2) con los grupos epsilon-amino de los restos de lisina de la proteína.

65 11. Conjugado de un antígeno de polisacárido exento de endotoxina (LPS) con una proteína portadora, que puede obtenerse mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

ES 2 293 002 T3

12. Vacuna que comprende un conjugado de un antígeno de polisacárido exento de endotoxina (LPS) con una proteína portadora según la reivindicación 11.

5 13. Vacuna según la reivindicación 12, en la que los polisacáridos tienen un contenido en endotoxina inferior a 0,125 unidades de endotoxina/ μ g de polisacárido, equivalente a menos de 0,00125 (p/p).

14. Vacuna según la reivindicación 12, que comprende un antígeno glucoconjugado específico para *Neisseria meningitidis* del grupo A.

10 15. Vacuna según la reivindicación 12, que comprende un antígeno glucoconjugado específico para *Neisseria meningitidis* del grupo C.

15 16. Vacuna según la reivindicación 12, que comprende un antígeno glucoconjugado específico para *Neisseria meningitidis* del grupo W135.

17. Vacuna según la reivindicación 12, que comprende un antígeno glucoconjugado específico para *Neisseria meningitidis* del grupo Y.

20 18. Vacuna según la reivindicación 12, que comprende múltiples antígenos glucoconjugados específicos para *Neisseria meningitidis* de los grupos A, C, W135 e Y.

19. Vacuna según la reivindicación 12, que comprende múltiples antígenos glucoconjugados específicos para *Streptococcus pneumoniae* de los grupos 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 18, 19 ó 23.

25 20. Vacuna según la reivindicación 12, que comprende un antígeno glucoconjugado específico para *Haemophilus influenzae* de tipo B.

30 21. Vacuna según la reivindicación 12, que comprende un antígeno glucoconjugado específico para *Salmonella typhi*.

22. Vacuna según la reivindicación 12, que comprende un antígeno glucoconjugado específico para *Vibrio cholerae*.

35

40

45

50

55

60

65