

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 579**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **98950831 .2**
96 Fecha de presentación: **29.09.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1019437**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2000**

54 Título: **Procedimiento para el acoplamiento covalente de polisacáridos o moléculas de proteína**

30 Prioridad:
02.10.1997 US 942852

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2012

73 Titular/es:
**CONNAUGHT LABORATORIES INCORPORATED
ROUTE 611, P.O.BOX 187
SWIFTWATER PENNSYLVANIA 18370-, US**

72 Inventor/es:
RYALL, Robert, P.

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 380 579 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

Procedimiento para el acoplamiento covalente de polisacáridos a moléculas de proteína.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para el acoplamiento covalente de polisacáridos y oligosacáridos a moléculas de proteína por despolimerización con peróxido de hidrógeno de las unidades de polisacárido, seguido de acoplamiento de la cadena de polisacárido despolimerizada a los grupos aminoácido de una proteína de interés mediante una molécula enlazadora.

Varias publicaciones hacen referencia a esta solicitud. La cita completa a estas publicaciones se encuentra donde se cita o al final de la memoria, que precede inmediatamente a las reivindicaciones. Estas publicaciones se refieren al estado de la técnica al que pertenece la invención; sin embargo, no existe reconocimiento de que alguna de estas publicaciones sea realmente la técnica anterior.

15 **Antecedentes de la invención**

En los últimos años, ha existido un interés considerable en desarrollar métodos para acoplar por enlace covalente polisacáridos y oligosacáridos a moléculas de proteína. Este método se ha aplicado en el área de desarrollo de vacunas, donde polisacáridos capsulares bacterianos purificados se han acoplado por enlace covalente a moléculas de proteína (Dick, W. E. *et al.*; 1989). Estas construcciones se han denominado vacunas conjugadas.

La razón para la preparación de estas construcciones es que los polisacáridos capsulares bacterianos purificados, que están clasificados como antígenos independientes de linfocitos T, pueden convertirse en antígenos similares a linfocitos T por acoplamiento covalente con determinadas moléculas de proteína. Las vacunas de polisacáridos no conjugados no pueden provocar una respuesta anamnésica en el hombre, y la respuesta inmunitaria a estos antígenos puede ser de duración limitada, especialmente en las poblaciones más jóvenes. Por esta razón, las vacunas de polisacáridos no han sido recomendadas para su utilización en poblaciones infantiles, debido a su eficacia limitada propia en esta población.

Durante los últimos diez a quince años, los polisacáridos capsulares purificados de *Haemophilus influenzae* tipo b se han unido por enlace covalente a numerosas moléculas de proteína, por ejemplo vacuna contra la difteria y proteína de la vacuna antitetánica, y estos conjugados son conocidos por provocar una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T en la población infantil. Esta característica ha permitido el desarrollo y obtención de licencias de vacunas eficaces contra la enfermedad producida por la bacteria *Haemophilus influenzae* tipo b (Santosham, M., 1993). Este método de preparación de vacunas conjugadas se ha extendido también a otros polisacáridos capsulares, tales como los purificados a partir de *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*.

40 **Objetivos y sumario de la invención**

Una ruta general que se ha utilizado para preparar estos conjugados de sacárido-proteína consiste en activar uno o más sitios en la cadena de sacárido de modo que estos sitios activados reaccionen con uno o más de los grupos aminoácido de la proteína.

En el desarrollo de una estrategia para acoplar por enlace covalente polisacáridos a proteínas, se describe una ruta en la que la cadena de polisacárido se despolimeriza inicialmente a oligosacáridos de peso molecular medio comprendido en el intervalo entre 10 y 30.000 por ejemplo, 10 a 25.000 daltons. Dos ventajas de la utilización de polisacáridos despolimerizados para preparar los conjugados son: (a) los conjugados preparados a partir de la utilización de polisacáridos despolimerizados puede ser propiamente más inmunógeno que los conjugados correspondientes preparados a partir de los polisacáridos completos; y (b) las reacciones utilizadas para preparar estas vacunas de conjugado pueden ofrecer un mayor grado de control, así como más versatilidad en el diseño del proceso, cuando se utilizan cadenas de polisacárido despolimerizadas frente a cadenas de polisacárido completas.

En algunos casos, se puede acoplar por enlace covalente las cadenas de polisacáridos despolimerizadas añadiendo un reactivo específico que permite la formación del enlace entre las moléculas de polisacárido y proteína. Dependiendo de la química que se utilice para llevar a cabo esta operación, pueden formarse uno o más enlaces entre el polisacárido y la proteína. En otros casos, se ha utilizado una ruta alternativa mediante la cual una pequeña molécula química se acopla al polisacárido despolimerizado o a la molécula de proteína, y esta molécula, debido a su propia reactividad, sirve como molécula enlazadora entre el polisacárido y la proteína. Estas moléculas se han denominado enlazadores químicos, enlazador y/o enlazador directo.

El procedimiento de la presente invención utiliza preferentemente éste último método, mediante el cual una molécula enlazadora se une a la cadena de polisacárido que proporciona el acoplamiento selectivo a grupos de aminoácido de la proteína. En este proceso, los polisacáridos se despolimerizan en primer lugar utilizando peróxido de hidrógeno en condiciones hidrolíticas suaves. La reacción de hidrólisis es un proceso bien controlado que proporciona una

distribución uniforme de cadenas de oligosacárido que reaccionan fácilmente con una hidrazida y/o una amina. El grado en el que la hidrazida o amina puede acoplarse a polisacáridos hidrolizados con peróxido de hidrógeno puede aumentarse mediante la adición de un compuesto reactivo de carbodiimida soluble en agua.

5 La razón de esta característica es que una determinada población de las cadenas de polisacárido despolimerizado posee un grupo químico que puede modificarse fácilmente con hidrazida o amina mediante la adición de carbodiimidias solubles en agua al medio de reacción. Estas cadenas de polisacárido resultantes modificadas por hidrazida/amina pueden unirse selectivamente a continuación a los grupos de ácido carboxílico de la proteína.

10 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una construcción que comprende un polisacárido y/o un oligosacárido acoplado por enlace covalente a una molécula de proteína, comprendiendo dicho procedimiento despolimerizar dicho polisacárido y/o oligosacárido utilizando peróxido de hidrógeno en condiciones hidrolíticas suaves, generando de este modo un grupo de ácido carboxílico en el que dichas condiciones suaves son una temperatura entre 30°C y 80°C y un pH entre 4,5 y 8,0 \pm 0,10; modificar el
15 polisacárido despolimerizado y/o el oligosacárido con una molécula seleccionada de entre el grupo que consiste en una amina y una hidrazida, en el que la modificación se lleva a cabo en presencia de una carbodiimida; y conjugar dicho polisacárido y/o oligosacárido modificado y despolimerizado con grupos de ácido carboxílico de una molécula de proteína.

20 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una construcción preparada según el procedimiento del primer aspecto.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición inmunológica, inmunógena o terapéutica que comprende la construcción según el segundo aspecto, en la que la construcción comprende un resto
25 seleccionado de entre el grupo constituido por un epítipo de interés, un modulador de la respuesta biológica y un factor de crecimiento, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que la proteína de dicha construcción puede provocar una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T en un hospedador inyectado con dicha proteína.

30 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende la composición inmunológica del tercer aspecto.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a una construcción según el segundo aspecto para provocar una respuesta inmunológica en un vertebrado, en la que la construcción comprende un resto seleccionado de entre
35 el grupo constituido por un epítipo de interés, un modulador de la respuesta biológica y un factor de crecimiento.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a una construcción según el segundo aspecto para tratar a un vertebrado necesitado de tratamiento, en la que la construcción comprende un resto seleccionado de entre el grupo
40 constituido por un epítipo de interés, un modulador de la respuesta biológica y un factor de crecimiento.

Las formas de realización preferidas de los aspectos de la presente invención están publicadas en las reivindicaciones 2 a 12.

45 Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención proporciona un proceso por el que los polisacáridos pueden degradarse o despolimerizarse de forma controlada en condiciones hidrolíticas suaves, es decir, utilizando bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno a temperaturas ligeramente elevadas y en condiciones ligeramente ácidas, básicas o neutras, es decir temperaturas en el intervalo entre 30 y 80°C y valores de pH en el intervalo entre 4,5 y 8,0 \pm 0,10.

50 Este procedimiento se adaptó sorprendentemente de la degradación de moléculas de carbohidrato por peróxido de hidrógeno alcalino en una variedad de condiciones de reacción (Isbell, H. S. *et al.*, 1987). Este proceso de despolimerización parece que procede por un ataque al azar a los enlaces glucosídicos por peróxido de hidrógeno, proporcionando una distribución uniforme del peso molecular de las cadenas de carbohidrato despolimerizado.

55 Históricamente, los polisacáridos se han despolimerizado mediante una variedad de métodos que incluyen calentamiento en condiciones ácidas, básicas o neutras, y radiación ultrasónica, fuerza de cizallamiento, escisiones catalizadas por enzimas, mediadas por radical, catalizadas por ión metálico y oxidación con peryodato cuando proceda (Yalpani, M., 1988). La capacidad de alguno de estos procedimientos para despolimerizar una cadena específica de polisacáridos viene dictada por la estructura física de la cadena de polisacárido. La predicción de las
60 mejores condiciones hidrolíticas es difícil, a veces, aún cuando se conoce la estructura de la unidad de polisacárido repetida.

Sin embargo, en contraste no esperado a los métodos históricos para despolimerizar polisacáridos, el procedimiento de la siguiente invención se ha aplicado a numerosos polisacáridos estructuralmente dispares.

65 La definición de las condiciones para obtener la distribución deseada de peso molecular es un proceso relativamente

sencillo, porque el único parámetro experimental más influyente en el procedimiento de la invención es la temperatura. Los demás parámetros experimentales que permiten finos ajustes de la distribución del peso molecular son el tanto por ciento de peróxido de hidrógeno utilizado en la mezcla de reacción y la duración de la reacción.

5 Se han propuesto numerosos mecanismos para la degradación alcalina de carbohidratos utilizando peróxido de hidrógeno (Isbell, H. S. *et al.*, 1987). La escisión de las cadenas parece ocurrir selectivamente en el enlace
 gucosídico. El azúcar del extremo reductor generado de este modo continúa en su estado de oxidación natural (es
 decir aldehído) o puede experimentar oxidación al siguiente estado de oxidación superior (es decir ácido
 10 reductor normales generados por hidrólisis ácida o básica, lo que sugiere que el azúcar del extremo reductor puede
 existir en una forma abierta y no como hemiacetal.

Según el mecanismo propuesto por Isbell (1987), el azúcar del extremo reductor puede experimentar degradación
 limitada en estas reacciones para dar una unidad de alditol más pequeña, dejando de éste modo el azúcar del
 15 extremo reductor en la forma abierta. Los datos disponibles apoyan la afirmación de que las cadenas generadas por
 despolimerización del peróxido de hidrógeno son mucho más reactivas para con las hidrazidas que las cadenas que
 son despolimerizadas por ácido o base.

Existen también cadenas de polisacárido despolimerizadas que contienen grupos que son reactivos con
 20 carbodiimidas solubles en agua, lo que permite más modificación con compuestos que contienen amina o hidrazida.
 Se pueden modificar ambos grupos de polisacárido en la misma reacción añadiendo el compuesto carbodiimida
 soluble en agua al medio de reacción.

La construcción puede proceder de un polisacárido bacteriano capsular despolimerizado y modificado seleccionado
 25 de entre el grupo constituido por los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *Streptococcus*
pneumoniae y los grupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*.

El peso molecular medio del poli/oligosacárido despolimerizado puede ser de 10 a 30.000 daltons, por ejemplo, 10-
 30 25.000 daltons.

La invención comprende además la construcción o composición que comprende la construcción para obtener una
 respuesta inmunitaria inmunológica o protectora o para el tratamiento o la terapia, por ejemplo administrando la
 construcción o la composición que comprende la construcción a un animal o ser humano.

35 Estos y otros objetivos y formas de realización se dan a conocer o resultan evidentes a partir de la siguiente
 descripción detallada y están comprendidos por la misma.

Breve descripción de las figuras

40 La figura 1A representa las características de S-2000 SEC del polisacárido Pn 19F despolimerizado;

la figura 1B representa el cromatograma S-2000 SEC para el polisacárido Pn 19F despolimerizado, en el que el
 trazado superior sigue el índice de refracción del eluyente de la muestra y el trazado inferior sigue la absorbancia al
 UV a 254 nm;

45 la figura 1C representa el perfil cinético para la despolimerización de polisacáridos por peróxido de hidrógeno;

la figura 2A representa la reacción de dextrano despolimerizado con peróxido de hidrógeno con dihidrazida del ácido
 50 adípico, después de UV a 300 y 210 nm a lo largo del tiempo;

la figura 2B representa la reacción de polisacárido 19F neumocócico despolimerizado con peróxido de hidrógeno
 con dihidrazida del ácido adípico, después de UV a 310 y 210 nm a lo largo del tiempo;

55 las figura 3A y 3B representan la hidrazona formada en la reacción de la hidrazida de ácido acético y glutaraldehído
 y la hidrazida del ácido acético y gliceraldehído, respectivamente, en la que la exploración con UV está comprendida
 entre 320 y 220 nm; y

las figuras 4A-C muestran las características de S-200 SEC del polisacárido Pn6B despolimerizado y modificado,
 60 respectivamente.

Descripción detallada de la invención

El procedimiento de la invención se ha aplicado a numerosos polisacáridos bacterianos capsulares claramente
 65 diferentes, así como a polisacáridos de dextrano comercializados, aunque el procedimiento no necesita limitarse
 únicamente a estos polisacáridos. Los polisacáridos bacterianos capsulares que han sido despolimerizados y
 modificados con hidrazida que contienen compuestos por este procedimiento incluyen los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B,

7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae* y los grupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*.

Según el procedimiento de la presente invención, los polisacáridos se disuelven en tampón Tris-HCL, citrato, acetato o fosfato (a la concentración del tampón de 50 a 100 mM), se calientan las soluciones entre 30 y 80°C y el pH se ajusta a un intervalo entre 4,5-8,0 ± 0,1. La adición de peróxido de hidrógeno se hace después que la solución ha alcanzado la temperatura deseada, y esta adición se toma como tiempo cero. Una vez que ha pasado el tiempo de calentamiento deseado, el material despolimerizado se enfría a temperatura ambiente. Esta etapa interrumpe la reacción hidrolítica. El peróxido de hidrógeno sin reaccionar puede neutralizarse ya sea añadiendo un agente reductor, tal como bisulfito sódico o por medios físicos de eliminación, por ejemplo, diálisis o ultrafiltración.

Las determinaciones de peso molecular se hacen por elución mediante una columna de exclusión de tamaño que se calibra utilizando patrones de dextrano comercializados. El número de grupos reductores finales puede determinarse utilizando el método de Park Johnson (Park, J. T. *et al.*, 1949). La recuperación del polisacárido se determina analizando uno o más de los azúcares componentes presentes en la unidad de polisacárido repetida.

Sigue la cinética de la reacción de despolimerización una reacción lineal representando el log del peso molecular medio (PM) medio del polisacárido despolimerizado frente al tiempo que se caliente la muestra (tiempo de reacción). Utilizando una serie de columnas de exclusión de tamaño, se ha descubierto que esta linealidad se extiende sobre el intervalo de PM de 10.000 a 500.000 daltons. En general, la temperatura de la reacción de despolimerización y la cantidad de peróxido utilizado en la reacción de despolimerización sirven como ajustes groseros para la velocidad de despolimerización, es decir, cuanto mayor es la temperatura, o mayor es la concentración de peróxido, más rápida es la reacción.

El tiempo de calentamiento, o tiempo de reacción, permite ajustes finos para conseguir el peso molecular medio deseado para el polisacárido despolimerizado. La concentración de polisacárido en el intervalo de 1 a 8 mg de polisacárido/ml de volumen de reacción no parece influir en el resultado de la despolimerización. El pH de la despolimerización se ha variado entre los intervalos de 5 a 8. Bajo una serie dada de condiciones de reacción en las que solamente se varía el pH de la mezcla, la extensión de la despolimerización a pH 7 u 8 es esencialmente la misma, sin embargo, la velocidad de la reacción es más lenta a pH inferior a 7.

La terminología "amina" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto de fórmula $R^1NR^2R^3$, en la que R^1 es alquilo C_1 a C_{20} (por ejemplo, C_1 - C_{12} , tal como C_1 - C_8) de cadena ramificada o lineal, alqueno de cadena ramificada o lineal, alquino, cicloalquilo de cadena ramificada o lineal y aromático no sustituido o sustituido (por ejemplo, fenilo, naftilo y feniltrilo), R^2 y R^3 , independientes entre si, es hidrógeno, alquilo C_1 a C_{20} (por ejemplo, C_1 - C_{12} , tal como C_1 - C_8) de cadena ramificada o lineal, alqueno de cadena ramificada o lineal, alquino de cadena ramificada o lineal, alquino de cadena ramificada o lineal, cicloalquilo de cadena ramificada o lineal y aromático no sustituido o sustituido (por ejemplo, fenilo, naftilo y feniltrilo), en los que alquilo C_1 - C_{20} (por ejemplo, C_1 - C_{12} , tal como C_1 - C_8) de cadena ramificada o lineal, alqueno de cadena ramificada o lineal, alquino de cadena ramificada o lineal, cicloalquilo de cadena ramificada o lineal y aromático no sustituido o sustituido (por ejemplo, fenilo, naftilo y feniltrilo) pueden estar sustituidos por NR^2N^3 , en el que R^2 y R^3 son como se definieron anteriormente.

Por otra parte, la terminología del término "hidrazida" se refiere a un compuesto de fórmula $NH_2NR^1R^2$, en la que R^1 y R^2 , independientes entre si, es hidrógeno, alquilo C_1 a C_{20} (por ejemplo, C_1 - C_{12} , tal como C_1 - C_8) de cadena ramificada o lineal, alqueno de cadena ramificada o lineal, alquino de cadena ramificada o lineal, cicloalquilo de cadena ramificada o lineal, aromático no sustituido o sustituido (por ejemplo fenilo, naftilo y feniltrilo) y carbonilo, en el que el alquilo C_1 - C_{20} (por ejemplo, C_1 - C_{12} , tal como C_1 - C_8) de cadena ramificada o lineal, alqueno de cadena ramificada o lineal, alquino de cadena ramificada o lineal, cicloalquilo de cadena ramificada o lineal y aromático no sustituido o sustituido (por ejemplo, fenilo, naftilo y feniltrilo) pueden estar sustituidos con $NR^1R^2NH_2$, en la que R^1 y R^2 son como se definieron anteriormente. En una forma de realización preferida, la hidrazida es $NH_2NR^1C(O)R^2C(O)NR^3NH_2$, y R^1 , R^2 y R^3 son como se definieron anteriormente.

La reacción de despolimerización proporciona una distribución simétrica media de cadenas de peso molecular, como se muestra en la figura 1. Todas las cadenas en la reacción de despolimerización experimentan hidrólisis, tal como se determina analizando la presencia de carbohidrato en el eluido de la columna de exclusión por tamaño, y la extensión de la despolimerización se controla por las variables experimentales descritas en la presente memoria. La recuperación de polisacárido de la reacción de despolimerización es casi cuantitativa, lo que sugiere que la reacción procede mediante una escisión al azar de enlaces glucosídicos al contrario de lo que es un proceso de degradación del grupo final.

Las cadenas de polisacárido hidrolizadas son muy reactivas para con las aminas e hidrazidas. Ésta parece ser una propiedad exclusiva del procedimiento de la invención, porque cuando el mismo polisacárido es despolimerizado por ácido o base, el polisacárido despolimerizado resultante no es reactivo o es relativamente lento para reaccionar con aminas e hidrazidas.

La base de Schiff que se forma a partir de las aminas reaccionantes con los polisacáridos despolimerizados puede estabilizarse por reducción utilizando cianoborohidruro sódico. Las hidrazonas formadas a partir de la reacción de

los polisacáridos despolimerizados con hidrazidas son propiamente mucho más estables que las bases de Schiff generadas con amina formadas al hacer reaccionar los polisacáridos despolimerizados con una amina. Las hidrazonas formadas a partir de los polisacáridos despolimerizados con hidrazida también pueden estabilizarse más por reducción utilizando algunas condiciones de reducción apropiadas, por ejemplo, cianoborohidruro sódico. Las reacciones con aminas o hidrazidas son relativamente rápidas en las condiciones apropiadas. La modificación de las cadenas despolimerizadas puede conseguirse dentro de un período de tiempo de varios minutos a 1 a 2 horas, agitando la mezcla de reacción a temperatura ambiente entre pH 5 a 8, en un medio acuoso. Estas reacciones pueden observarse siguiendo el aumento de absorbancia a 237 nm como se muestra en la figura 2. Esta absorbancia parece ser debida a la formación de hidrazona, porque su λ_{\max} es aproximadamente la misma que la λ_{\max} observada para la hidrazona haciendo reaccionar dihidrazida adípica con glutaraldehído y gliceraldehído, como se muestra en la figuras 3A y 3B.

Además, parece que existen dos grupos reactivos diferentes que se producen como resultado de la reacción de despolimerización. Como se señala en la presente memoria, un grupo parece ser un aldehído reactivo, basándose en las observaciones siguientes: las cadenas de polisacárido despolimerizado poseen actividad reductora cuando se analizan por el método de Park Johnson (Par, J. T., *et al.*, 1949). La actividad reductora puede eliminarse cuando las cadenas de polisacárido despolimerizado se tratan con borohidruro sódico, y las cadenas de polisacárido despolimerizado presentan reactividad con reactivos que son conocidos por reaccionar con aldehídos, tales como las dihidrazidas.

El segundo grupo que se genera a partir de estas reacciones de despolimerización parece ser un grupo ácido carboxílico. Los grupos ácido carboxílico parecen surgir de la oxidación de los grupos aldehído terminales durante el transcurso de la realización de despolimerización, lo que está de acuerdo con los mecanismos de reacción que se han propuesto (expuestos en la presente memoria).

La existencia del grupo ácido carboxílico se ha demostrado de la manera siguiente: cuando el polisacárido despolimerizado, tal como dextrano T-2000 o el polisacárido capsular tipo 14 de *Streptococcus pneumoniae* ambos de los cuales son neutros, y ninguno de los cuales contiene un grupo de ácido carboxílico natural, se reduce en primer lugar con borohidruro sódico, en la medida en que toda la actividad reductora asociada al polisacárido se elimina, a continuación este polisacárido reducido ya no se observa que es reactivo con las hidrazidas cuando los dos se mezclan e condiciones que normalmente conducen a la reacción; sin embargo, cuando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC) está incluido en la misma mezcla de reacción, la hidrazida se incorpora en las cadenas de polisacárido despolimerizado reducido. Las cadenas de polisacárido despolimerizado no reducido que se mezclan con los compuestos de hidrazida tal como dihidrazida adípica o 1,6-diamohexano conducirán a la reacción, por lo que las hidrazidas proporcionan enlaces de hidrazona estables a los polisacáridos despolimerizados, y las aminas reaccionan para formar acoplamiento de la base de Schiff inestables a los polisacáridos despolimerizados. Tanto las bases de Schiff como las hidrazonas pueden estabilizarse por reducción utilizando algunas condiciones de reducción apropiadas, por ejemplo cianoborohidruro sódico. Cuando EDAC está incluido en esta última reacción, la concentración de hidrazida que se incorpora en las cadenas de polisacárido es mayor que cuando la reacción se lleva a cabo sin EDAC.

Esta serie de resultados sugiere que durante el transcurso de la despolimerización, las cadenas se escinden en primer lugar de modo aleatorio en el enlace glucosídico que proporciona un residuo de azúcar reductor final. El azúcar reductor final contiene ya sea un grupo aldehído, o en algunos casos este grupo aldehído experimenta más oxidación a un grupo de ácido carboxílico. El nivel de modificación es coherente con cada cadena que se modifica con una hidrazida reactiva o una amina reactiva dependiendo del reactivo conjunto utilizado. El nivel teórico de incorporación de hidrazida o amina puede determinarse a partir del peso molecular del polisacárido despolimerizado tomando el recíproco del peso molecular medio, por ejemplo si el peso molecular medio de un polisacárido despolimerizado dado es 10.000, entonces el nivel máximo teórico de modificación para cada miligramo de polisacárido es 100 nmoles, suponiendo una zona reactiva por cadena.

La tabla 1 proporciona un listado de numerosos polisacáridos despolimerizados, junto con sus pesos moleculares medios, el nivel teórico de modificación de hidrazida y el nivel observado de modificación. Además, la figura 4A es un cromatograma de filtración en gel de un polisacárido despolimerizado. La figura 4B es un segundo cromatograma de filtración en gel del mismo polisacárido después de la modificación con dihidrazida adípica. Como se muestra en la figura 3B la distribución de hidrazida se solapa con la distribución del peso molecular en el polisacárido. Además, existe una relación lineal con respecto al nivel de modificación con el peso del polisacárido, como se muestra en la figura 4C, como sería de esperar con una única zona de modificación por cadena al contrario que una modificación de la zona aleatoria.

Tabla 1. Resumen del nivel de modificación de hidrazida para polisacáridos despolimerizados con peróxido de hidrógeno

Tipo de Ps	Lote de Ps	PM por SEC	nmoles AH por mg	PM por grupo final	Relación de <u>PM_{sec}</u> PM por ejemplo
Pn3	D01305	19,000	82	12,200	1.56
Pn4	D01306	17,000	109	9,200	1.85
Pn6B	D01300	17,400	103	9,700	1.79
Pn9V	D01304	17,000	90	11,100	1.53
Pn14	D01302	17,900	64	15,600	1.15
Pn18C	D01038	18,000	82	12,200	1.48
Pn19F	D01299	15,900	90	11,100	1.43
Pn23F	D01310	13,900	125	8,000	1.74
MenA	D01270	19,300	97	10,300	1.87
MenC	D01741	19,100	55	18,200	1.05

5 Como se expone en la presente memoria, el procedimiento de la invención para la modificación utiliza una pequeña molécula, por ejemplo dihidrazida adípica o 1,6-diaminohexano, que está unida por enlace covalente al polisacárido despolimerizado con peróxido de hidrógeno. Estas pequeñas moléculas están unidas al polisacárido despolimerizado por uno de dos enlaces o conexiones distintas. En el caso de la dihidrazida adípica, el enlace que une la pequeña con el polisacárido despolimerizado se cree que es un enlace de hidrazida, que procede de la
10 reacción de la dihidrazida adípica que reacciona con el supuesto ácido carboxílico activado por EDAC. En el caso de 1,6-diaminohexano, el enlace se cree que es un enlace amino, que procede de la reducción con cianoborohidruro sódico de la base de Schiff y un enlace amido, que procede de la reacción de 1,6-diaminohexano que reacciona con el supuesto ácido carboxílico activado por EDAC. Estos polisacáridos modificados son capaces de reaccionar fácilmente de manera selectiva con grupos de ácido carboxílico activados, tales como los ácidos carboxílicos
15 activados con carbodiimida y ésteres de N-hidroxisuccinimida de ácidos carboxílicos.

Dependiendo de cómo se desea diseñar el conjugado objetivo, que posee una sola zona selectiva reactiva, es decir, una zona de modificación con una amina o hidrazida, en el polisacárido permite varias selecciones. Se puede conectar selectivamente el polisacárido despolimerizado modificado con hidrazida o amina directamente a los
20 grupos de ácido carboxílico de proteínas, utilizando ya sea EDAC o EDAC en presencia de N-hidroxisuccinimida. Alternativamente, se puede modificar más el polisacárido despolimerizado modificado con hidrazida o amina con otras pequeñas moléculas activadas, tales como los enlazadores bifuncionales disponibles en el mercado (es decir, cualquier molécula química que tenga dos restos reactivos distintos cada uno capaz de formar un enlace con una proteína y/o un aminoácido) y esto permitirá la reacción de otros grupos en la proteína tales como los grupos amino
25 y/o tiol.

Además, está comprendido dentro de lo que sobreentienden los expertos en la materia seleccionar las condiciones de reacción apropiadas para poner en práctica la presente invención, dadas las instrucciones generales proporcionadas en la presente memoria, es decir, específicamente con respecto a la selección del polisacárido y
30 proteína de interés, agentes reductores, condiciones de tampón y restos de conexión apropiados, sin apartarse del espíritu del alcance de la invención.

El polisacárido y/o la proteína a la que debe acoplarse contiene preferentemente uno o más de los siguientes: un epítipo de interés, un modulador de la respuesta biológica o un factor de crecimiento. Con respecto a estos
35 términos, se hace referencia a la siguiente exposición, y generalmente a Kendrew, THE ENCYCLOPEDIA OF MOLECULAR BIOLOGY (Blackwell Science Ltd., 1995) y Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

Un epítipo de interés es una región inmunológicamente relevante de un antígeno o inmunógeno o un fragmento de la misma inmunológicamente activo, por ejemplo, procedente de un patógeno o toxina de interés veterinario o humano. Un epítipo de interés puede prepararse a partir de un antígeno de un patógeno o toxina, por ejemplo, un antígeno de un patógeno o toxina humano, o de otro antígeno o toxina que provoque una respuesta con respecto al patógeno, tal como, por ejemplo: un antígeno de Morbillivirus, por ejemplo, un virus del moquillo canino o del sarampión o un antígeno de la peste bovina tal como HA o F; una glucoproteína de la rabia, por ejemplo, la
40 glucoproteína G de la rabia; el antígeno de la gripe, por ejemplo, el virus HA o N de la gripe o un antígeno de la gripe aviar, por ejemplo, HA de la gripe del pavo, el antígeno de la gripe del pollo/Pensilvania/1/83 tal como una nucleoproteína (NP); un antígeno del virus de la leucemia bovina, por ejemplo, cápsula gp51,30; antígeno del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), por ejemplo, HN o F; un antígeno del virus de la leucemia felina (VLF_e), por ejemplo, la proteína de la cápsula del VLF_e; RAV-1 env; matriz y/o preplomer del virus de la bronquitis infecciosa; una glucoproteína de herpesvirus, por ejemplo, una glucoproteína del herpesvirus felino, del herpesvirus equino, del herpesvirus bovino, virus de la seudorrabia, herpesvirus canino, VSH, virus de la enfermedad de Marek, virus de Epstein-Barr o citomegalovirus; un antígeno de flavivirus, por ejemplo, un antígeno del virus de la encefalitis japonesa (VEJ), un antígeno de la fiebre amarilla o un antígeno del virus del Dengue; un antígeno del paludismo
50

(*Plasmodium*); un antígeno del virus de la inmunodeficiencia, por ejemplo, un antígeno del virus del antígeno de la inmunodeficiencia felina (VIF) o un antígeno del virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) o un antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); un antígeno de parvovirus, por ejemplo, de parvovirus canino; un antígeno de la gripe equina; un antígeno de poxvirus, por ejemplo, un antígeno de ectromelia, un antígeno del virus de la viruela del canario o un antígeno del virus de la viruela aviar; un antígeno del virus de la bursitis infecciosa, por ejemplo, VP2, VP3, VP4; un antígeno del virus de la hepatitis, por ejemplo, HBsAg; un antígeno del virus de Hantaan; un antígeno del *C. tetani*; un antígeno de la parotitis; un antígeno neumocócico, por ejemplo, PspA; un antígeno de *Borrelia*, por ejemplo, OspA, OspB, OspC de *Borrelia* asociado a la enfermedad de Lyme tales como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelli* y *Borrelia garinii*; o un antígeno de la viruela del pollo (varicella zoster). Por lo tanto, la proteína y/o el polisacárido puede ser un antígeno o inmunosacárido, o una parte del mismo que contiene el epítipo. Se prefiere actualmente emplear un epítipo de interés procedente de la gripe tipo b de *Haemophilus* de la gripe, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*.

En cuanto a los epítipos de interés, un experto en la materia puede determinar un epítipo o una región inmunodominante de un péptido o polipéptido a partir del conocimiento en la técnica sin demasiada experimentación.

Por ejemplo, un epítipo de interés puede generarse sin demasiada experimentación a partir del conocimiento del aminoácido y de las secuencias del ADN correspondientes del péptido o polipéptido, así como de la naturaleza de aminoácidos específicos (por ejemplo, tamaño, carga, etc.) y el diccionario del codón. Véase, por ejemplo, Ivan Roitt, *Essential Immunology*, 1988; Kendrew, anteriormente; Janis Kuby, *immunology*, 1992 por ejemplo, págs. 79-81. Algunas directrices para determinar si una proteína es un epítipo de interés que estimule una respuesta, incluyen: longitud del péptido- el péptido debería ser de por lo menos 8 ó 9 aminoácidos de longitud para adaptarse dentro del complejo MHC de clase I y por lo menos 13 a 25 aminoácidos de longitud para adaptarse dentro de un complejo MHC de clase II. Esta longitud es un mínimo para el péptido que se une al complejo MHC. Se prefiere para los péptidos que sean mayores de estas longitudes porque las células pueden cortar péptidos. El péptido debería contener un motivo de anclaje apropiado que permita unirse a las diversas moléculas de clase I o clase II con suficiente especificidad para generar una respuesta inmunitaria (véase Bocchia, M. *et al.*, Specific Binding of Leukemia Oncogene Fusion Protein Peptides to HLA Class I Molecules *Blood* 85:2680-2684; Engelhard V. H., Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules *Ann. Rev. Immunol.* 12:181 (1994)). Ésto puede realizarse, sin demasiada experimentación, comparando la secuencia de la proteína de interés con las estructuras publicadas de los péptidos asociados a las moléculas MHC. Por lo tanto, el experto en la materia puede determinar un epítipo de interés comparando la secuencia de proteínas con las secuencias listadas en la base de datos de proteínas.

Aún más, otro procedimiento es simplemente para generar partes de una proteína de interés, generar anticuerpos monoclonales contra esas porciones de la proteína de interés, y a continuación averiguar si los anticuerpos inhiben el crecimiento *in vitro* del patógeno del que procede la proteína.

Por lo tanto, el experto en la materia puede utilizar instrucciones publicadas en esta exposición y en la técnica para generar partes de una proteína de interés para análisis en cuanto si los anticuerpos contra éste inhiben el crecimiento *in vitro*. Por ejemplo, el experto en la materia puede generar partes de una proteína de interés: seleccionando 8 a 9 o 13 a 25 porciones de 25 aminoácidos de longitud de la proteína, seleccionando la zonas hidrófilas, seleccionando las porciones mostradas para unir a partir de los datos de los rayos X del complejo antígeno (completo)-anticuerpo, seleccionando las regiones que se diferencian en las secuencias de otras proteínas, seleccionando los motivos de fijación del anclaje del HLA potencial o cualquier combinación de estos procedimientos o de otros procedimientos conocidos en la técnica.

Los epítipos reconocidos por los anticuerpos se expresan en la superficie de una proteína. Para determinar las regiones de una proteína la más probable para estimular una respuesta del anticuerpo un experto en la materia puede llevar a cabo preferentemente un mapa de epítipos, utilizando los procedimientos generales descritos anteriormente, u otros procedimientos de cartografía conocidos en la técnica.

Como puede apreciarse en lo expuesto anteriormente, sin demasiada experimentación, a partir de esta exposición y el conocimiento de la materia, el experto en la materia puede determinar la secuencia de aminoácidos de un epítipo de interés para obtener una respuesta de linfocitos T, de linfocitos B y/o de anticuerpos para su utilización en la puesta en práctica de la invención. Además, se hace referencia a Gefter *et al.*, patente US nº 5.019.384, publicado el 28 de Mayo de 1991, y los documentos citan (observar especialmente el apartado "Bibliografía aplicable" de esta patente, y la columna 13 de esta patente que da a conocer que: "Se han identificado un gran número de epítipos para una amplia variedad de organismos de interés. De particular interés son los epítipos a los que se dirigen los anticuerpos neutralizantes. Las descripciones de dichos epítipos están en muchas de las referencias citadas en el apartado Bibliografía aplicable.").

Con respecto a un modulador de la respuesta biológica se hace referencia a Wohlstadter, "Selection Methods", documento WO 93/19170, publicado el 30 de Septiembre de 1993, y los documentos citados en la presente memoria. El experto en la materia puede obtener un modulador de respuesta biológica para su utilización en la invención, sin demasiada experimentación.

Un factor de crecimiento puede definirse como péptidos de señalización intercelular polifuncionales que actúan localmente que controlan tanto la ontogenia como el mantenimiento del tejido y la función (véase Kendrew, anteriormente, especialmente la página 455 y siguientes). El experto en la materia puede obtener un factor de crecimiento para su utilización en la invención, sin demasiada experimentación.

En cuanto a las construcciones de la invención, debe apreciarse que en la práctica de la invención pueden utilizarse técnicas para la purificación de proteínas, y dichas técnicas, en general, incluyen técnicas normales de purificación de proteínas para más purificación de la proteína de interés, incluyendo: precipitación aprovechando la solubilidad de la proteína de interés al variar las concentraciones salinas, precipitación con disolventes orgánicos, polímeros y otros materiales, precipitación por afinidad y desnaturalización selectiva; cromatografía en columna, incluyendo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), intercambio iónico, afinidad, inmuoafinidad o cromatografía de colorante-ligando, inmunoprecipitación y la precipitación en gel, procedimientos electroforéticos, ultrafiltración y enfoque isoeléctrico. Cada uno de los procedimientos identificados anteriormente están comprendidos dentro del conocimiento del experto en la materia, y no se requiere demasiada experimentación para purificar las construcciones de la invención, utilizando las metodologías normales esbozadas en la presente memoria, y en la bibliografía, así como las metodologías en los ejemplos más adelante.

La invención se refiere además a una composición inmunógena, inmunológica o de vacuna que contiene la construcción de la invención y opcionalmente un vehículo o diluyente aceptable (por ejemplo, veterinaria o farmacéuticamente aceptables). Una composición inmunológica que contiene la construcción produce una respuesta inmunológica, local o generalizada. La respuesta puede, pero no necesita ser protectora. Una composición inmunógena así mismo produce una respuesta inmunológica local o generalizada que puede, pero no necesita ser, protectora. Una composición de vacuna produce una respuesta protectora local o generalizada. Por lo tanto, las expresiones "composición inmunológica" y "composición inmunógena" incluyen una "composición de vacuna" (en cuanto a los dos términos anteriores pueden ser composiciones protectoras).

La invención, por lo tanto, proporciona también una construcción de la invención o una composición inmunógena, inmunológica o de vacuna que comprende la construcción de la invención y un vehículo o diluyente aceptable para su utilización en un procedimiento de provocación de una respuesta inmunológica en un vertebrado que comprende administrar al vertebrado una construcción de la invención o una composición inmunógena, inmunológica o de vacuna que comprende la construcción de la invención, y un vehículo o diluyente aceptable. En el contexto de la presente memoria, "animal" incluye todas las especies de vertebrados, excepto los humanos; y "vertebrado" incluye todos los vertebrados incluyendo los animales (como se utiliza "animal" en la presente memoria) y seres humanos. Y, desde luego, un subconjunto de "animal" es mamífero, que para la presente memoria incluye todos los mamíferos, excepto los seres humanos.

En cuanto a los antígenos para su utilización en composiciones de vacuna o inmunológicas, se hace referencia a los documentos citados en la presente memoria, la exposición publicada en los documentos citados en la presente memoria y el conocimiento en la materia, por ejemplo, Stedman's Medical Dictionary (24^a edición, 1982, por ejemplo, definición de vacuna; para una lista de antígenos utilizados en formulaciones de vacuna; dichos antígenos o epítomos de interés de estos antígenos pueden utilizarse en la invención, como construcción sola o en una composición polivalente que contiene por lo menos una construcción de la invención).

Cuando la construcción comprende un factor de crecimiento y/o un modulador de respuesta biológica, la invención proporciona además una composición terapéutica que contiene además la construcción de la invención y opcionalmente un vehículo o diluyente aceptable (por ejemplo, veterinaria o farmacéuticamente aceptable), por ejemplo, para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de un vertebrado, animal o ser humano necesitado del tratamiento que comprende la administración de la construcción o composición que comprende a la construcción al vertebrado, animal o ser humano. Además, como composiciones inmunológicas, antigénicas, inmunógenas o de vacunas que se están utilizando actualmente en terapias, la invención comprende una composición terapéutica que contiene la construcción de la invención que comprende un epítomo de interés y opcionalmente un vehículo o diluyente aceptable (por ejemplo, veterinaria o farmacéuticamente aceptable), por ejemplo, para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de un vertebrado, animal o ser humano necesitado del tratamiento que comprende administrar la construcción o la composición que comprende la construcción al vertebrado, animal o ser humano.

El procedimiento de administración para las construcciones de la invención, las composiciones de la invención tales como las composiciones inmunológicas, antigénicas, o de vacuna o las composiciones terapéuticas pueden ser por vía parenteral (intradérmica, intramuscular o subcutánea). Dicha administración permite una respuesta inmunitaria generalizada. La administración puede ser por vía de las fosas, por ejemplo, oral, nasal, genital, etc. Dichas administración permite una respuesta inmunitaria local.

Más generalmente, las composiciones antigénicas, inmunológicas o de vacuna de la invención o las composiciones terapéuticas pueden prepararse de acuerdo con las técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en técnicas farmacéuticas, médicas o veterinarias. Dicha composiciones pueden administrarse en dosis y por técnicas

- bien conocidas por los expertos en las técnicas médica o veterinaria teniendo en consideración factores tales como la raza o especie, la edad, el sexo, el peso, la genética y el estado del paciente específico y la vía de administración. Las composiciones pueden administrarse solas, o pueden administrarse conjuntamente o administrarse sucesivamente con otras composiciones de la invención o con otras composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna o terapéuticas. Tales otras composiciones se administran teniendo en cuenta los factores mencionados anteriormente.
- Los ejemplos de composiciones de la invención incluyen las preparaciones líquidas para administración por orificios (por ejemplo, oral, nasal, anal, genital, por ejemplo, vaginal, etc.) tales como suspensiones, jarabes o elixires; y, preparados para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable) tales como suspensiones o emulsiones estériles. En dichas composiciones la construcción puede mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tales como agua esterilizada, solución salina fisiológica, glucosa o similares.
- Las composiciones antigénicas, inmunológicas o de vacuna por lo general pueden contener un adyuvante y una cantidad de la construcción para provocar la respuesta deseada. En aplicaciones humanas, el alumbre (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) es un adyuvante típico. La saponina y su componente purificado Quil A, el adyuvante completo de Freud y otros adyuvantes se utilizan en investigación y aplicaciones veterinarias. Pueden utilizarse también las preparaciones definidas químicamente tales como dipéptido muramilo, monofosforil líquido A, conjugados de fosfolípido tales como los descritos por Godman-Snitkoff *et al.*, *J. Immunol. Exp. Med.* 147:410-415 (1991), la encapsulación de la proteína dentro de un proteoliposoma tal como describe Miller *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1739-1744 (1992), y la encapsulación de la proteína en vesículas de lípido tales como las vesículas de lípido Novasome™ (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, NH).
- La composición puede rellenarse en una única forma farmacéutica para la inmunización o el tratamiento por administración parenteral (por ejemplo, intramuscular, intradérmica o subcutánea), o administración por orificios, por ejemplo, perlingual (por ejemplo, oral), intragástrica, por las mucosas incluyendo la administración intraoral, intraanal, intravaginal y similares. Y de nuevo, la dosis eficaz y la vía de administración se determinan por la naturaleza de la composición, por la naturaleza de la construcción y por factores conocidos, tales como el cruce o la especie o la raza, la edad, el peso, la genética, el estado y naturaleza del vertebrado o animal o ser humano, así como la DL₅₀ y otros procedimientos de identificación que son conocidos y no requieren demasiada experimentación. Las dosis de construcción pueden variar de unos pocos a unos pocos centenares de microgramos, por ejemplo 5 a 500 µg.
- Los vehículos o diluyentes adecuados pueden ser agua o una solución salina tamponada, con o sin conservante. La construcción puede estar liofilizada para la resuspensión en el momento de la administración o pueden estar en solución. El vehículo puede ser también un sistema polimérico de liberación retardada. Véase, por ejemplo, Kreuter, J. Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacology, M. Donbrow (ed). CRC Press, págs. 125-148. La microencapsulación se ha aplicado a la inyección de productos farmacéuticos microencapsulados para proporcionar una liberación controlada. Los ejemplos de polímeros útiles para microencapsulación son los policarbonatos, poliésteres, poliuretanos, poliortoésteres y poliamidas, particularmente los que son biodegradables.
- Un vehículo para liberación retardada puede ser también la poli(d,1-lactico-co-glicolida) (PLGA). Véase, por ejemplo, Eldridge, J. H. , *et al.* Current Topics in Microbiology and Immunology. 1989, 146:59-66. La oclusión en microesferas de PLGA de 1 a 10 micras de diámetro pueden tener un efecto adyuvante cuando se administran por vía oral. El proceso de microencapsulación de PLGA utiliza una separación de fases de una emulsión agua en aceite. El compuesto de interés se prepara como una solución acuosa y la PLGA se disuelve en un disolvente orgánico adecuado tal como cloruro de metileno y acetato de etilo. Estas dos soluciones inmiscibles se emulsionan conjuntamente por agitación a alta velocidad. Se añade a continuación una sustancia no disolvente del polímero, produciendo la precipitación del polímero alrededor de las gotitas acuosas para formar microcápsulas embrionarias. Las microcápsulas se recogen, y se estabilizan con uno de entre una variedad de agentes (alcohol polivinílico (APV), gelatina, alginatos, polividona (PVP), metilcelulosa) y el disolvente se elimina por secado al vacío o extracción con disolvente.
- De este modo, se crean composiciones sólidas, incluyendo las sólidas que contienen líquido, líquidas y gel (incluyendo las "cápsulas de gelatina").
- Además, las construcciones de la invención pueden utilizarse en cualquier régimen de inmunización o administración deseado; por ejemplo, como parte de vacunaciones periódicas tales como vacunaciones anuales como en las técnicas veterinarias o como en las vacunaciones periódicas como en las técnicas médicas humanas, o como en un régimen de primer refuerzo en el que una construcción o composición de la invención que comprende una construcción que se administra ya sea antes o después de la administración del mismo o de un epítipo diferente de interés o de una construcción que comprende dicho epítipo de interés igual o diferente.
- Además, las construcciones de la invención pueden utilizarse para estimular una respuesta en la células *in vitro* o *ex vivo* para la posterior reinfusión en un paciente. Si el paciente es seronegativo la reinfusión es para estimular una

respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmólógica o antigénica tal como la inmunización activa. En un individuo seropositivo, la reinfusión es para estimular o reforzar el sistema inmunitario contra un patógeno.

5 Una mejor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas puede extraerse de los siguientes ejemplos no limitativos proporcionados a título ilustrativo.

Ejemplos

10 **Ejemplo 1 – Despolimerización del polisacárido conjugado serotipo 19F de *Streptococcus pneumoniae***

Los materiales utilizados en el proceso de despolimerización incluyen el serotipo 19F del polisacárido capsular, tris (hidroximetil)aminometano 50 mM preparado en agua destilada esterilizada, peróxido de hidrógeno al 30%, ácido clorhídrico 0,1 N esterilizado, hidróxido sódico 0,1 N esterilizado y solución salina esterilizada (0,85%).

15 Se cargó un Wheaton Celstir™ de un litro de con 580 ml de tampón tris 50 mM, pH 8,0. Se calentó el tampón a 80°C ± 0,5°C utilizando un baño de agua en recirculación a temperatura constante. Cuando el tampón alcanzó 80°C, se añadieron al tampón calentado 1.500 mg de polisacárido capsular serotipo 19F de *Streptococcus pneumoniae*. Una vez disuelto todo el polisacárido (por lo general en 15 a 30 minutos), se ajustó el pH a 8,0 ± 0,1. A esta solución se añadieron 20 ml de peróxido de hidrógeno al 30% para dar una concentración final del 1%, y la mezcla resultante se agitó a 80°C durante 30 minutos. Después de 30 minutos, la mezcla se enfrió rápidamente a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 6,0 ± 0,5 utilizando HCl 0,1 N. El polisacárido despolimerizado se purificó por ultrafiltración utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial minisetete de Filtron equipada con un casete con unidad de canal en pantalla de polietersulfona modificada con un corte de peso molecular (MWCO) 1.000 de Omega. Se utilizaron seis volúmenes de solución salina al 0,85% para eliminar las especies de pequeño peso molecular. La solución de polisacárido despolimerizado se concentró utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial mini-ultrasetete de Filtron equipada con un casete con unidad de canal en pantalla de polietersulfona modificada con MWCO 3.000 de Omega.

30 El peso molecular del polisacárido despolimerizado se determinó mediante el paso a través de una columna sephacryl S-200 que se estandarizó previamente utilizando patrones de peso molecular de dextrano. La cantidad de polisacárido recuperado se determinó analizando ramnosa (metilpentosa) utilizando el método de Dische, Z. y Shettles, L. B. (1948) *Journal of Biological Chemistry* 175, págs. 595-603. El contenido en fósforo se determina por el método de Bartlett, G. R. J. (1959) *Journal of Biological Chemistry*, 234, 466. La actividad reductora se determina por el método de Park, J. T. & Johnson, M. J. (1949) *Journal of Biological Chemistry* 181, págs. 149-151.

35 El polisacárido en esta etapa es adecuado para la modificación con una mina o hidrazida.

El procedimiento de la invención se utiliza también para los serotipos 9V y 14 del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* y para el grupo A procedente de *Neisseria meningitidis*. La cantidad de polisacárido modificado de 9V y 14 recuperada se determina analizando galactosa utilizando el método con orcinol/ácido sulfúrico de Weiner, H. E. y Moshin, J. R. (1952) *American Review of Tuberculosis* 68, pág. 594. La cantidad de N-acetil-manosamina en el serotipo 9V y la cantidad de N-acetilglucosamina en el serotipo 14 se determina por el método de Elson, L. A. & Morgan, W. T. (1933) *Biochemical Journal* 27, 1824. La cantidad del grupo A se determina analizando fósforo por el método de Bartlett.

45 **Ejemplo 2 – Modificación del polisacárido conjugado serotipo 19F de *Streptococcus pneumoniae***

Los materiales utilizados en el proceso de modificación incluyen el serotipo 19F del polisacárido capsular despolimerizado con peróxido de hidrógeno, del apartado A, dihidrazida del ácido adípico, EDAC, cianoborohidruro sódico, ácido clorhídrico 0,1 N esterilizado, hidróxido sódico 0,1 N esterilizado y solución salina fisiológica esterilizada (0,85%).

55 Un vaso de precipitados de un litro, equipado con una barra agitadora y sonda de pH, se cargó con el polisacárido despolimerizado concentrado preparado según el ejemplo 1, y se diluyó con solución salina fisiológica al 0,85% esterilizada para conseguir una concentración de la reacción final de 6,0 mg/ml. A esta solución se le añadió una alícuota concentrada de dihidrazida adípica y EDAC, cada una disuelta en solución salina fisiológica al 0,85% esterilizada, de modo que cada una estaba a una concentración en la reacción final de 0,1 mg/ml. Después de añadir EDAC a la mezcla de reacción, el pH se mantuvo a 5,0 ± 0,1 durante dos horas utilizando ácido clorhídrico 0,1 N, mientras se mantenía la temperatura de reacción a 22°C ± 0,5°C. Después de dos horas, una alícuota concentrada de cianoborohidruro sódico disuelta en solución salina fisiológica al 0,85% esterilizada, se añadió a la mezcla de reacción, de modo que la concentración de la reacción final fue de 2,0 mg/ml. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 5,0 ± 0,1 durante una hora a 22°C ± 0,5°C, y la reacción se dejó agitar a la misma temperatura durante 44 horas ± 4 horas. Después de este periodo de reacción, el pH se justó a 6,0 ± 0,1, y el polisacárido modificado se purificó por ultrafiltración utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial minisetete de Filtron, equipada con un casete de unidad de canal de pantalla, de polietersulfona modificada con 1.000 MWCO de Omega. Se utilizaron seis volúmenes de solución salina fisiológica al 0,85% para eliminar pequeñas moléculas. El

polisacárido modificado se concentró utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial mini-ultrasette de Filtron equipada con una casete con unidad de canal en pantalla de polietersulfona modificada con MWCO 3.000 de Omega. Se determinó la cantidad de polisacárido por los métodos descritos en el ejemplo 1. La concentración de hidrazida se determina por el método del ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico de Snyder, S. L. y Sobocinski, P. Z. (1975) *Analytical Biochemistry* 64, págs. 284-288.

El procedimiento de la invención se utiliza también para preparar los serotipos 9V y 14 modificados con dihidrazida adípica procedentes de *Streptococcus pneumoniae* y para el grupo A procedente de *Neisseria meningitidis*.

5 **Ejemplo 3 – Conjugación del polisacárido conjugado de serotipo 19F de *Streptococcus pneumoniae***

Los materiales utilizados en este preparado incluyen el serotipo 19F modificado con dihidrazida adípica, preparado según el ejemplo 2, vacuna antidiftérica esterilizada, EDAC, sulfato amónico, ácido clorhídrico 0,1 N esterilizado, hidróxido de sodio 0,1 N esterilizado y solución salina fisiológica esterilizada (0,85%).

15 Un vaso de precipitados de un litro, equipado con una barra agitadora y sonda de pH, se cargó con el polisacárido modificado del ejemplo 2 y se diluyó con solución salina fisiológica al 0,85% esterilizada para conseguir una concentración en la reacción final de 500 nmoles de hidrazida reactiva/ml. A esta solución se le añadió vacuna antidiftérica esterilizada hasta una concentración final de 3,8 mg/ml. La reacción se inició añadiendo una alícuota concentrada de EDAC hasta una concentración final de 2,25 mg/ml. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 5,0 ± 0,1, y este pH se mantuvo durante dos horas utilizando ácido clorhídrico 0,1 N. Después de dos horas, se ajustó el pH a 7,0 ± 0,1 utilizando hidróxido sódico 0,1 N y la reacción se guardó a 5°C ± 3°C durante 21 horas ± 3 horas.

25 Después de este periodo, se calentó la mezcla a 22°C ± 1°C, y se ajustó el pH a 6,5 ± 0,5 utilizando ácido clorhídrico 0,1 N. La mezcla de reacción se sometió a tres precipitaciones sucesivas con sulfato amónico de la manera siguiente. Se añadió sulfato amónico en forma sólida hasta saturación del 70%, y el conjugado precipitado se recogió por centrifugación. El conjugado se disolvió en solución salina fisiológica esterilizada al 0,85%, y se repitió el proceso de precipitación. Después de la tercera precipitación, el conjugado se diafiltró utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial minisette de Filtron, equipada con un casete con unidad de canal en pantalla, de polietersulfona modificada con MWCO 30.000 de Omega. Se utilizaron seis volúmenes de solución salina fisiológica al 0,85% para eliminar pequeñas moléculas. El conjugado filtrado por diálisis se filtró en primer lugar a través de una cápsula filtrante que contenía un filtro de 1,2 µm y uno de 0,45 µm, y a continuación se filtró a través de una segunda cápsula filtrante que contenía un filtro de 0,22 µm. La cantidad de polisacárido, se determinó por los métodos descritos en el ejemplo 1. La cantidad de proteína se determina por el análisis de proteínas de Lowry, O. H. *et al.* (1951) *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

El procedimiento de la invención se utiliza también para preparar conjugados de polisacárido para los serotipos 9V y 14 procedentes de *Streptococcus pneumoniae* y el grupo A de *Neisseria meningitidis*.

40 **Ejemplo 4 – Despolimerización del polisacárido conjugado de serotipo 19F de *Streptococcus pneumoniae***

Los materiales utilizados en el proceso de despolimerización incluyen el serotipo 6B del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, tampón de fosfato sódico 100 mM esterilizado, ácido clorhídrico 0,1 N esterilizado, hidróxido sódico 0,1 N esterilizado, peróxido de hidrógeno al 30%, y solución salina fisiológica esterilizada (0,85%).

45 Se cargó un Wheaton Celstir™ de un litro de con 580 ml de tampón tris 50 mM, pH 8,0. Se calentó el tampón a 75°C ± 0,5°C utilizando un baño de agua en recirculación a temperatura constante. Cuando el tampón alcanzó 75°C ± 0,5°C, se añadieron al tampón calentado 1.500 mg de serotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae*. Una vez disuelto todo el polisacárido, se ajustó el pH a 8,0 ± 0,1. A esta solución se añadieron 20 ml de peróxido de hidrógeno al 30% para dar una concentración final del 1%. La mezcla resultante se mantuvo a 75°C durante 25 a 35 minutos. Al término del tiempo asignado, la mezcla se enfrió rápidamente a temperatura ambiente y el pH de la mezcla se redujo a 6,0 ± 0,5 utilizando HCl 0,1 N. El polisacárido despolimerizado se purificó por ultrafiltración utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial minisette de Filtron equipada con un casete con unidad de canal en pantalla de polietersulfona modificada con un MWCO 1.000 de Omega. Se utilizaron seis volúmenes de solución salina al 0,85% para eliminar las especies de pequeño peso molecular. La solución de polisacárido despolimerizado se concentró utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial mini-ultrasette de Filtron equipada con un casete con unidad de canal en pantalla de polietersulfona modificada con MWCO 3.000 de Omega.

60 Las determinaciones de peso molecular, la actividad reductores, el contenido en fósforo y ramnosa se llevaron a cabo como en el ejemplo 1.

El procedimiento de la invención se utilizó para los serotipos 3, 4, 7F, 18C y 23F del polisacárido capsular procedentes de *Streptococcus pneumoniae*. La cantidad de serotipo 3 se determina analizando ácido glucurónico utilizando el método de Dische, Z. (1947) *Journal of Biological Chemistry* 167, pág. 189, y la cantidad de glucosa se determina utilizando el método de Weiner y Moshin con orcinol/ácido sulfúrico. La cantidad de serotipo 4 se determina analizando galactosa por el método de Weiner y Moshin con orcinol/ácido sulfúrico, la cantidad de N-

acetilmanosamina y de N-acetilgalactosamina se determina por el método de Elson y Morgan. La cantidad de serotipo 7F se determina analizando la ramnosa por el método de Dische y Shettles, la cantidad de galactosa se determina por el método de Weiner y Moshin con orcinol/ácido sulfúrico, la cantidad de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina se determina por el método de Elson y Morgan. La cantidad de serotipo 18C se determina analizando la ramnosa por el método de Dische y Shettles, la cantidad de fósforo se determina por el método de Bartlett y la cantidad de galactosa se determina por el método de orcinol/ácido sulfúrico de Weiner y Moshin. La cantidad de serotipo 23F se determina analizando la ramnosa por el método de Dische y Shettles, la cantidad de fósforo se determina por el método de Bartlett y la cantidad de galactosa se determina por el método de Weiner y Moshin con orcinol/ácido sulfúrico, los pesos moleculares y el contenido actividad reductora de cada uno de los polisacáridos citados en este ejemplo se determinaron por los métodos descritos en el ejemplo 1.

Ejemplo 5 – Modificación del polisacárido conjugado de serotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae*

El procedimiento y los materiales descritos en el ejemplo 2 se utilizan para preparar el polisacárido capsular serotipo 6B modificado con hidrazida de ácido adípico. Esta misma serie de procedimientos de reacción se utiliza también para preparar los serotipos 3, 4, 7F, 18C, y 23F del polisacárido capsular modificados con ácido adípico procedentes de *Streptococcus pneumoniae*.

Ejemplo 6 – Despolimerización de polisacárido conjugado de serotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae*

El procedimiento y los materiales descritos en el ejemplo 3 se utilizan para preparar el polisacárido conjugado de serotipo 6B. La misma serie de procedimientos de reacción se utiliza también para preparar los conjugados de polisacárido de serotipos 3, 4, 7F, 18C y 23F procedentes de *Streptococcus pneumoniae*.

Ejemplo 7 – Despolimerización de los polisacáridos conjugados del grupo A de *Neisseria meningitidis*

Los materiales utilizados en esta preparación incluyen el grupo A de polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis*, tampón tris 50 mM esterilizado, ácido clorhídrico 0,1 N esterilizado, hidróxido sódico 0,1 N esterilizado, peróxido de hidrógeno al 30%, y solución salina fisiológica esterilizada (0,85%).

Se cargó un Wheaton Celstir™ de un litro con 580 ml de tampón citrato 50 mM, pH 6,0. Se calentó el tampón a 60°C ± 0,5°C utilizando un baño de agua en recirculación a temperatura constante. Cuando el tampón alcanzó 60°C, se añadieron al tampón calentado 1.500 mg de polisacárido capsular del grupo A de *Neisseria meningitidis*. Una vez disuelto todo el polisacárido, se ajustó el pH a 6,0 ± 0,1. A esta solución se añadieron 20 ml de peróxido de hidrógeno al 30% para dar una concentración final del 1% y la mezcla resultante se agitó a 60°C durante 120 minutos.

En este ejemplo, la reacción se realizó a velocidad lenta con el fin de hacer el seguimiento el peso molecular del polisacárido utilizando una columna HPSEC, en la que los cromatogramas se tomaban cada 15 minutos. Después de 120 minutos, se enfrió la mezcla rápidamente a temperatura ambiente. El polisacárido despolimerizado se purificó por ultrafiltración utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial minisetete de Filtron equipada con una unidad casete de canal con pantalla de polietersulfona MWCO 1.000 de Omega modificada. Se utilizaron seis volúmenes de solución salina fisiológica al 0,85% para eliminar especies de peso molecular pequeño. La solución de polisacárido despolimerizado se concentró utilizando una unidad de filtración de flujo tangencial mini-ultrasette de Filtron equipada con una unidad de casete de canal con pantalla de polietersulfona MWCO 3.000 de Omega modificada.

El peso molecular, la actividad reductora y el contenido en fósforos determinaron como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 8 – Modificación del conjugado de polisacárido, grupo A, de *Neisseria meningitidis*

Los materiales utilizados en este preparado incluyen el grupo A de polisacáridos capsulares despolimerizados con peróxido de hidrógeno procedentes de *Neisseria meningitidis*, del apartado A, dihidrazida del ácido adípico, EDAC, cianoborohidruro sódico, sulfosuccinimidil-4(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, ácido clorhídrico 0,1 N esterilizado, hidróxido sódico 0,1 N esterilizado y solución salina fisiológica esterilizada (0,85%).

Un vaso de precipitados de un litro, equipado con una barra agitadora y sonda de pH, se cargó con el polisacárido despolimerizado concentrado, del apartado A, y se diluyó con solución salina fisiológica al 0,85% esterilizada para conseguir una concentración de la reacción final de 6,0 mg/ml. A esta solución se le añadió una alícuota concentrada de dihidrazida adípica y EDAC, cada una se disolvió en solución salina fisiológica al 0,85% esterilizada, de modo que cada una estaba a una concentración en la reacción final de 1,0 mg/ml. Después de añadir EDAC a la mezcla de reacción, el pH se mantuvo a 5,0 ± 0,1 durante dos horas utilizando ácido clorhídrico 0,1 N, mientras se mantenía la temperatura de reacción a 22°C ± 0,5°C. Después de dos horas, una alícuota concentrada de cianoborohidruro sódico disuelta en solución salina fisiológica al 0,85% esterilizada, se añadió a la mezcla de reacción, de modo que la concentración de la reacción final fue de 2,0 mg/ml. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 5,0 ± 0,1 durante una hora a 22°C ± 0,5°C, y a continuación la reacción se dejó agitar a la misma temperatura durante 44 horas ± 4 horas. Después de este periodo de reacción, el pH se justó a 6,0 ± 0,1, y el

polisacárido modificado se purificó por ultrafiltración utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial miniset de Filtron, equipada con un casete de unidad de canal de pantalla, de polietersulfona modificada con 1.000 MWCO de Omega. Se utilizaron seis volúmenes de solución salina fisiológica al 0,85% para eliminar pequeñas moléculas. El polisacárido modificado se concentró utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial mini-ultrasete de Filtron equipada con una casete con unidad de canal en pantalla de polietersulfona modificada con MWCO 3.000 de Omega. Se determinó la cantidad de polisacárido por los métodos descritos en el apartado A. La concentración de hidrazida se determina por el método del ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico de Snyder, S. L. y Sobocinski, P. Z. (1975) *Analytical Biochemistry* 64, págs. 284-288.

Un vaso de precipitados de un litro, equipado con una barra de agitación y sonda de pH, se cargó el polisacárido del grupo A anterior modificado con hidrazida, y se diluyó con solución salina fisiológica al 0,85% esterilizada para conseguir una concentración de hidrazida reactiva final de 1.000 nmoles de hidrazida reactiva/ml. A esta solución se le añadió sulfosuccinimidil-4(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato sólido hasta una concentración final de 6,6 mg/ml. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a $6,5 \pm 0,1$ y la reacción se agitó durante 22 horas \pm 2 horas a $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Después de este periodo de reacción el pH se ajustó a $6,0 \pm 0,1$ y el polisacárido modificado con maleimido se purificó por ultrafiltración utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial miniset de Filtron, equipada con una unidad de casete de canal con pantalla de polietersulfona 1.000 MWCO de Omega modificada. Se utilizaron seis volúmenes de solución salina fisiológica al 0,85% para eliminar pequeñas moléculas. El polisacárido modificado se concentró utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial mini-ultrasete de Filtron equipada con una unidad de casete con canal de pantalla de polietersulfona 3.000 MWCO de Omega modificada. La cantidad de polisacárido se determinó por los métodos descritos en el apartado A. La cantidad de maleimida se determina por valoración del tiol utilizando reactivo de Ellman.

Ejemplo 9 – Conjugación del conjugado del polisacárido del grupo A de *Neisseria meningitidis*

Los materiales utilizados en este preparado incluyen el maleimido modificado del grupo A, del ejemplo 8, vacuna antidiftérica esterilizada, EDAC, dihidrocloruro de cistamina, ditiotreitól, sulfato amónico, ácido clorhídrico 01 N esterilizado, hidróxido sódico 0,1 N esterilizado, solución salina fisiológica esterilizada (0,85%) y tampón tris 50 mM esterilizado pH 7,5, que contiene EDTA 0,5 mM.

Un vaso de precipitados de un litro, equipado con una barra de agitación y una sonda de pH, se cargó con vacuna antidiftérica esterilizada, y se diluyó con solución salina fisiológica al 0,85% para proporcionar una concentración final de 4 mg/ml. A esta solución se le añadió una alícuota concentrada de dihidrocloruro de cistamina, disuelta en solución salina fisiológica al 0,85% hasta una concentración final de 11 mg/ml. El pH de la mezcla se ajustó a pH $7,0 \pm 0,1$, y se inició la reacción añadiendo una alícuota concentrada de EDAC hasta una concentración final de 2,25 mg/ml. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a $7,0 \pm 0,1$ a $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y a continuación se dejó en agitación durante 22 horas \pm 2 horas, a la misma temperatura. Después de esta reacción, la proteína modificada se purificó por ultrafiltración utilizando una unidad de filtración el flujo tangencial miniset de Filtron, equipada con una unidad de casete de canal con pantalla de polietersulfona 10.000 MWCO de Omega modificada. Se utilizaron seis volúmenes de tris 50mM pH 7,5, que contenían EDTA 0,5 mM para eliminar las pequeña moléculas. La cantidad de proteína se determina por el método de Lowry. La cantidad de cistamina se determina analizando la amina o por valoración del tiol después de la reducción de los enlaces disulfuro utilizando ditiotreitól.

Un vaso de precipitados de un litro, equipado con una barra de agitación y una sonda de pH, se cargó la vacuna antidiftérica modificada con cistamina y se diluyó con tris 50 mM pH 7,5, que contenía EDTA 0,5 mM. A esto se añadió ditiotreitól en forma sólida hasta una concentración final de 15 mg/ml. La reacción se agitó a $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante dos horas. Después de este periodo de reacción, la vacuna antidiftérica modificada con cistamina reducida se purificó por ultrafiltración utilizando una unidad de filtración en flujo tangencial miniset de Filtron, equipada con una unidad de casete en canal con pantalla de polietersulfona modificada de 10.000 MWCO de Omega. Se utilizaron seis volúmenes de tris 50 mM pH 7,5, que contenían EDTA 0,5 mM para eliminar las moléculas pequeñas. La cantidad de proteína se determina por el método de Lowry, la cantidad de tiol se determina por valoración utilizando el reactivo de Ellman.

A un vaso de precipitados de un litro equipado con una barra de agitación y una sonda de pH se cargó la vacuna antidiftérica modificada con cistamina reducida y se diluyó con tris 50 mM pH 7,5, que contenía EDTA 0,5 mM hasta una concentración de reacción final de 6 mg/ml. A esta solución se le añadió un exceso de 1,5 molar del grupo A modificado con maleimido, del apartado B. Esta reacción se dejó en agitación a $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, durante un total de 22 ± 2 horas. Después de este periodo de reacción, el pH de la mezcla se ajustó a $6,5 \pm 0,1$, y el conjugado se purificó mediante tres precipitaciones con sulfato amónico sucesivas. Después de la tercera precipitación, el conjugado se diafiltró utilizando una unidad de filtración el flujo tangencial miniset de Filtron, equipada con una unidad de casete de canal con pantalla de polietersulfona 30.000 MWCO de Omega modificada. Se utilizaron seis volúmenes de solución salina fisiológica al 0,85% para eliminar las pequeña moléculas. El conjugado diafiltrado se filtró en primer lugar a través de una cápsula filtrante que contenía un filtro de $1,2 \mu\text{m}$ y $0,45 \mu\text{m}$ y a continuación se filtró a través de una segunda cápsula filtrante que contenía un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. La cantidad de polisacárido se determina por fósforo por el método de Bartlett. La cantidad de proteína se determina por el método de Lowry.

El mismo procedimiento se utiliza también para preparar conjugados de polisacárido para los serotipos, 3, 4, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F procedentes de *Streptococcus pneumoniae*.

5

Referencias

1. Dick, W.E. Jr. and Beurret, M. Conjugate Vaccines. Contrib. Microbiol. Immunol. (1989) 10, pp. 48-114, Cruse, J.M. and Lewis, R.E. Jr. eds. Basel, Karger.
- 10 2. Santosham, M. (1993) Vaccine 11: 552-557.
3. Isbell, H.S. and Frush, H.L. (1987) Carbohydrate Research 161: 181-193
- 15 4. Yalpani, M. Polysaccharides Syntheses, Modifications and Structure/Property Relations (1988) Elsevier, Amsterdam, pp. 370-388.
5. Park, J.T. and Johnson, M.J. (1949) J. Biol. Chem. 181:149.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una construcción que comprende un polisacárido y/o un oligosacárido acoplado por enlace covalente a una molécula de proteína, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 despolimerizar dicho polisacárido y/o oligosacárido utilizando peróxido de hidrógeno en condiciones hidrolíticas suaves, generando de este modo un grupo de ácido carboxílico, en el que dichas condiciones suaves son una temperatura de 30°C a 80°C y un pH de 4,5 a 8,0 ± 0,10;
- 10 modificar el polisacárido despolimerizado y/o el oligosacárido con una molécula seleccionada de entre el grupo constituido por una amina y una hidrazida, en el que la modificación se lleva a cabo en presencia de una carbodiimida; y
- 15 conjugar dicho polisacárido y/o oligosacárido modificado y despolimerizado con grupos de ácido carboxílico de una molécula de proteína.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho polisacárido es un polisacárido bacteriano capsular seleccionado de entre el grupo constituido por los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae* y los grupos A, C, 14₁₃₅ e Y de *Neisseria meningitidis*.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha despolimerización es a un peso molecular medio de 10 a 30.000 daltons.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha amina es el 1,6-diaminohexano.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha hidrazida es la dihidrazida adípica.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la carbodiimida es la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.
- 30 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho polisacárido y/o oligosacárido modificado y despolimerizado comprende una sola zona reactiva selectiva.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha conjugación comprende conectar directamente el polisacárido y/o oligosacárido modificado y despolimerizado a un grupo de ácido carboxílico de la molécula de proteína.
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha conjugación comprende además la utilización de un reactivo de carbodiimida soluble en agua en presencia de N-hidroxisuccinimida.
- 40 10. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho polisacárido modificado y despolimerizado es adicionalmente modificado con un enlazador bifuncional.
- 45 11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el reactivo de carbodiimida soluble en agua es la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.
12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la construcción comprende un resto seleccionado de entre el grupo constituido por un epítipo de interés, un modulador de la respuesta biológica y un factor de crecimiento.
- 50 13. Construcción preparada de acuerdo con el procedimiento según la reivindicación 1.
14. Construcción preparada de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 12.
- 55 15. Composición inmunológica, inmunógena o terapéutica que comprende la construcción según la reivindicación 14 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que la proteína de dicha construcción puede provocar una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T en un hospedador inyectado con dicha proteína.
16. Vacuna que comprende la composición inmunológica según la reivindicación 15.
- 60 17. Construcción según la reivindicación 14, para provocar una respuesta inmunológica en un vertebrado.
18. Construcción según la reivindicación 14, para su utilización en medicina.

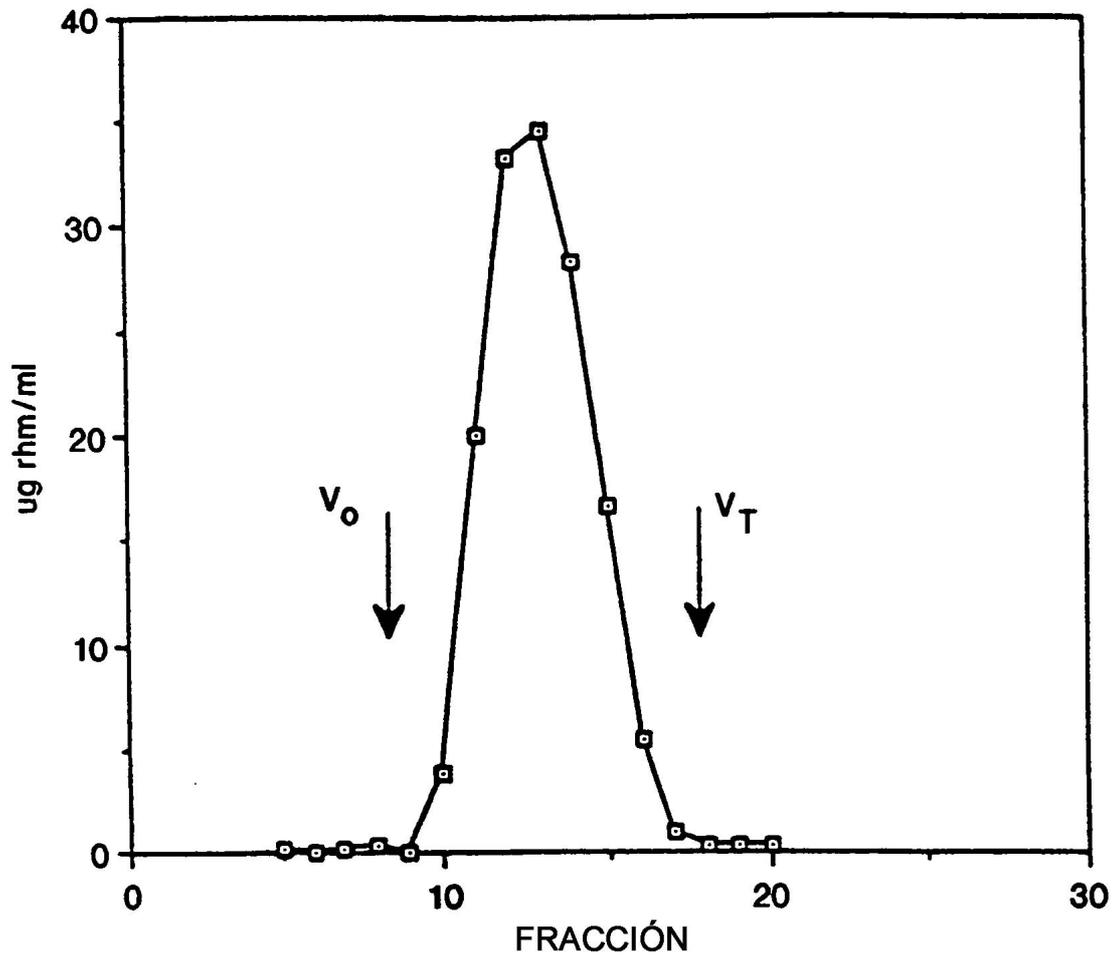


FIG. 1A

FRACCIÓN 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

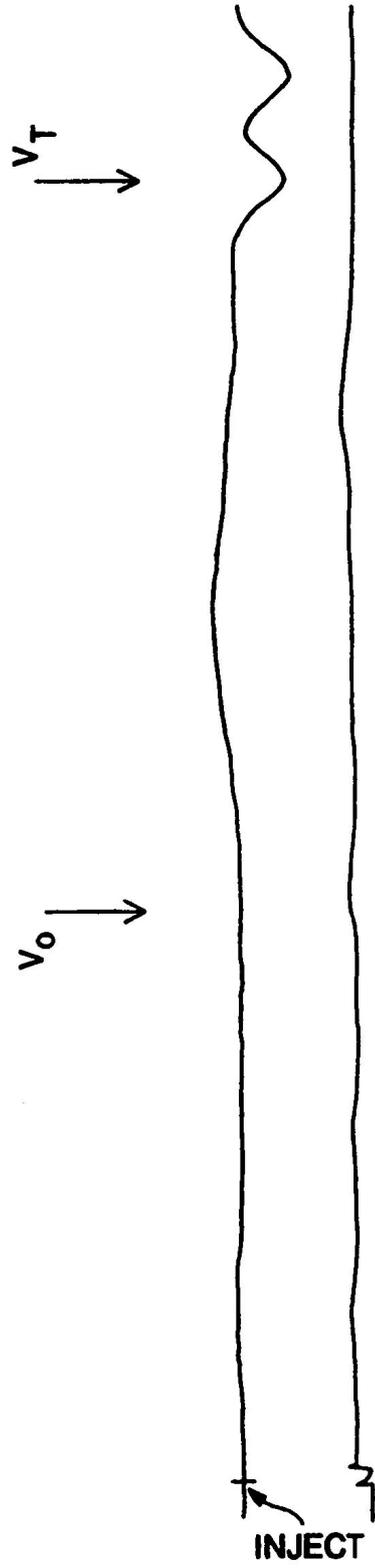


FIG. 1B

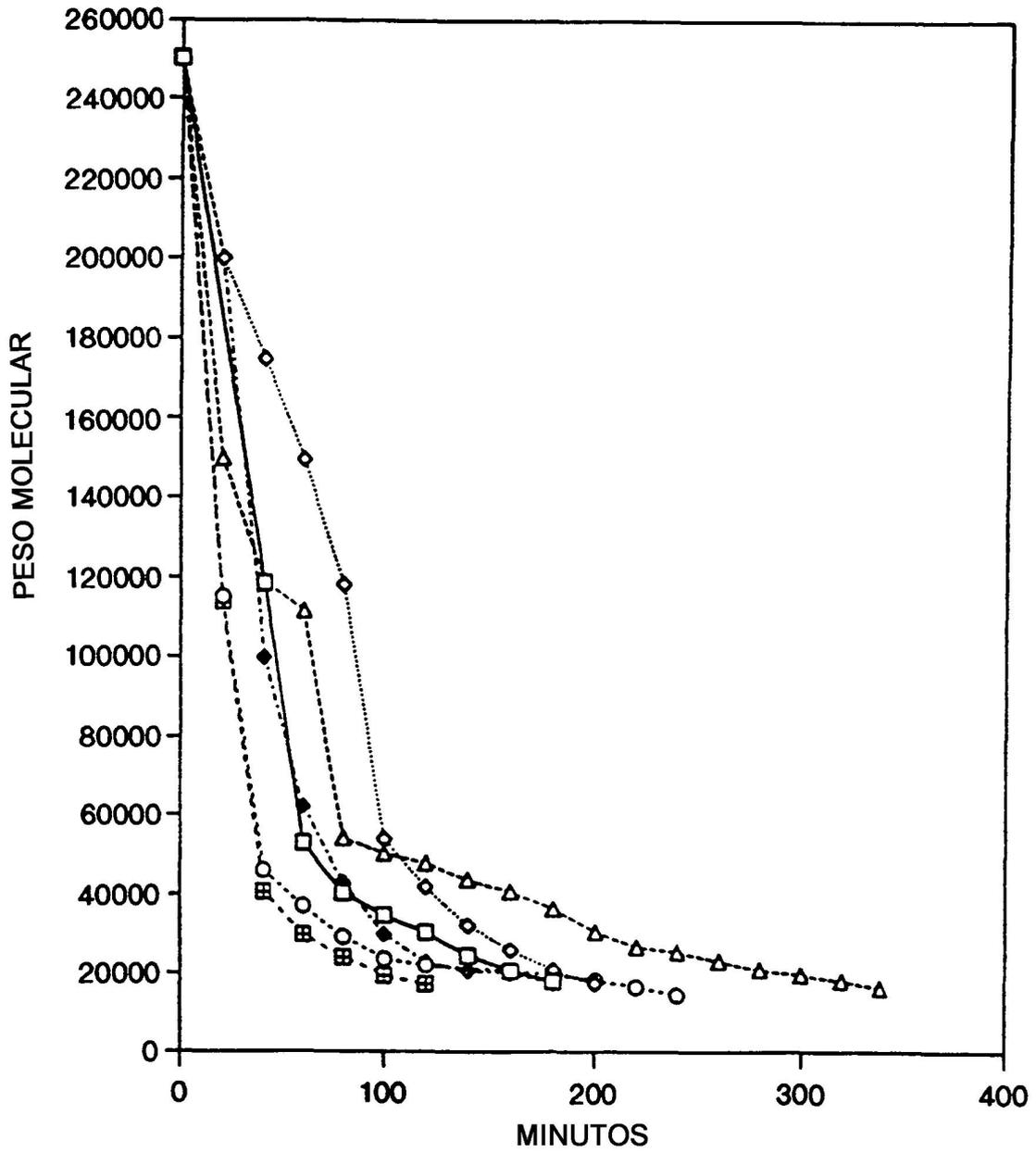


FIG. 1C

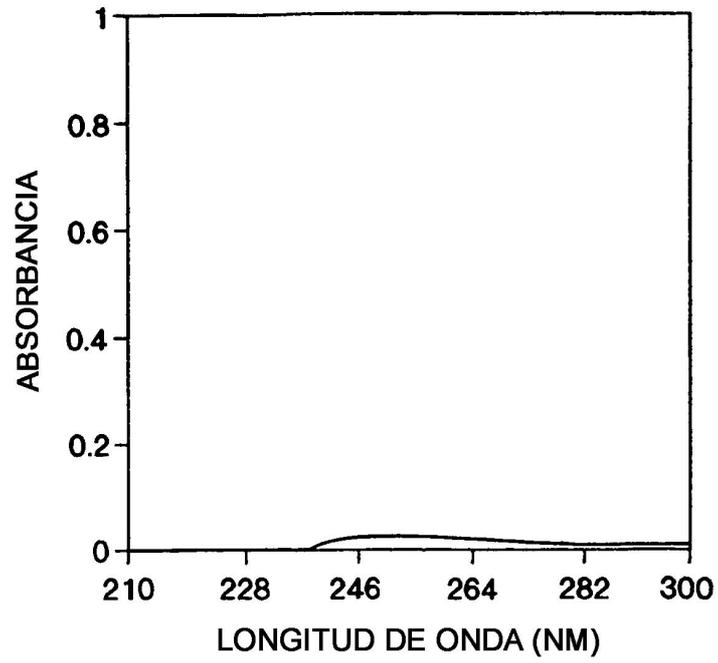


FIG. 2A-1

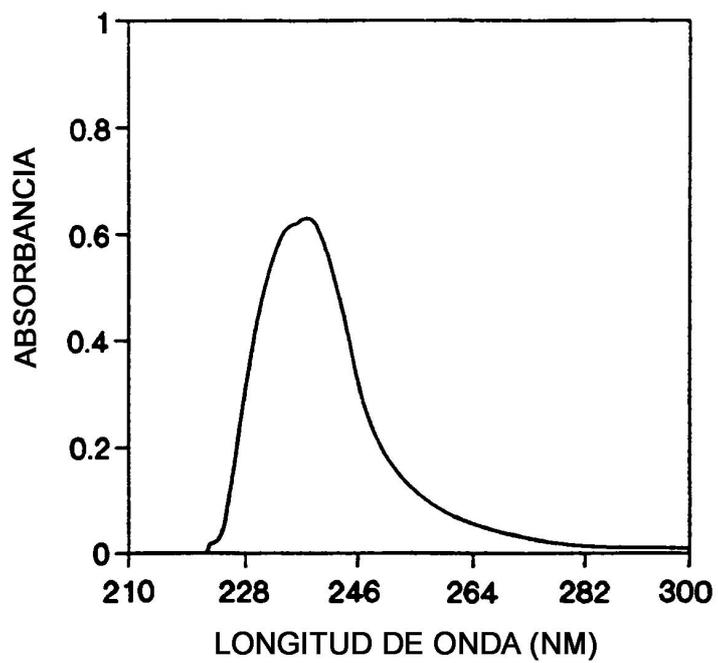


FIG. 2A-2

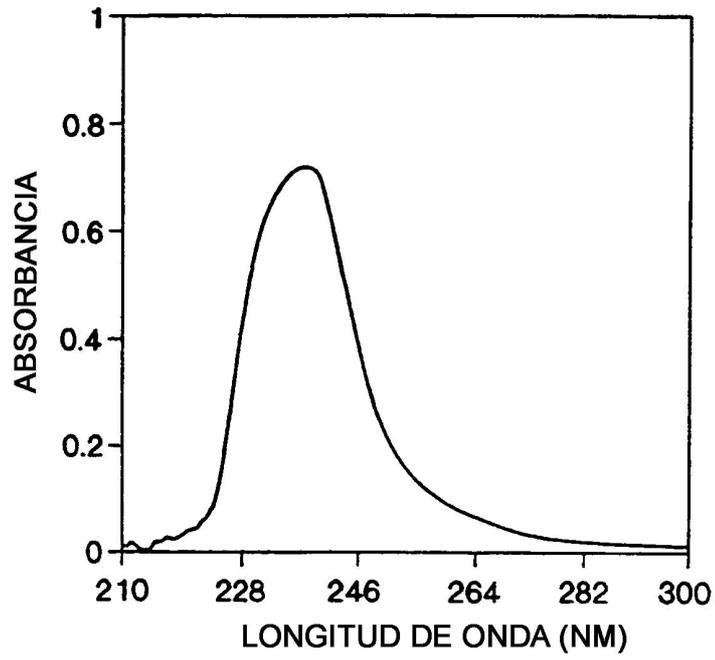


FIG. 2A-3

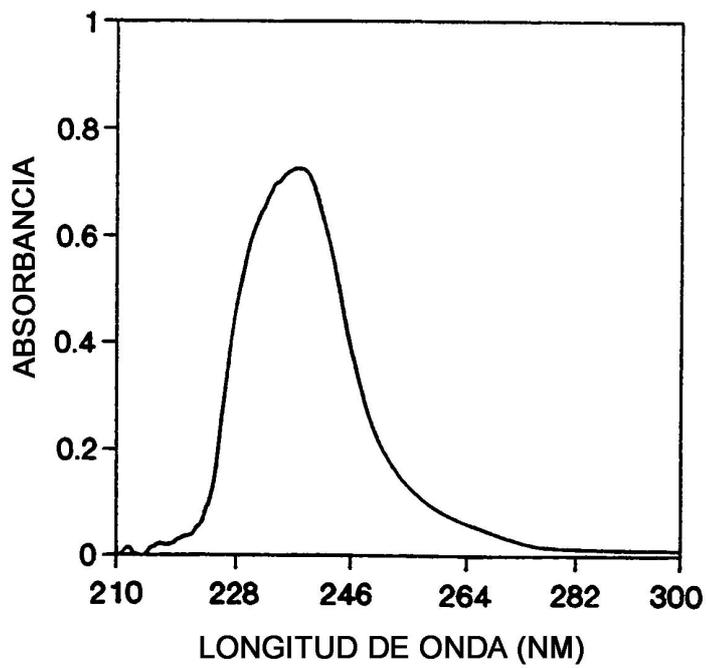


FIG. 2A-4

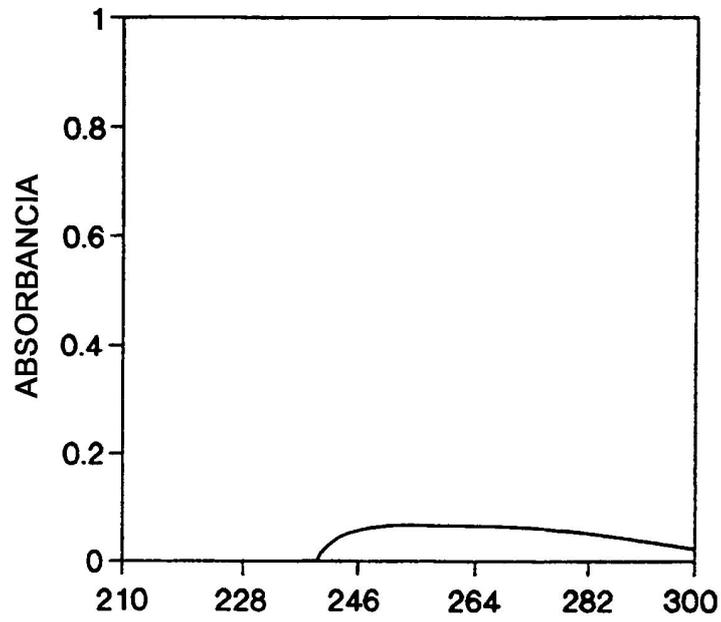


FIG. 2B-1

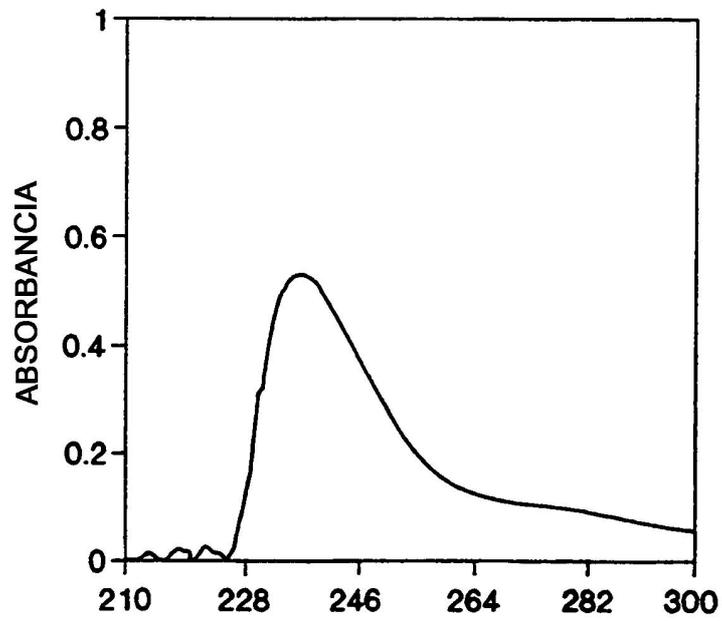


FIG. 2B-2

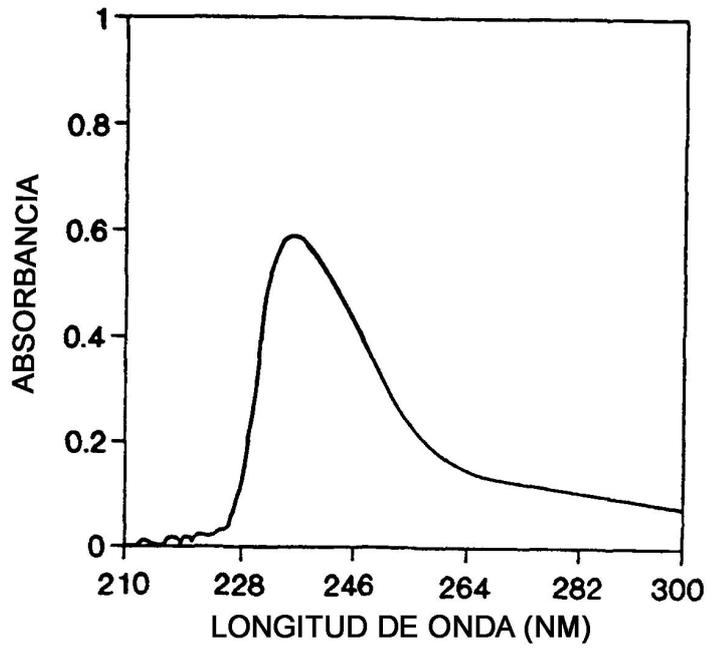


FIG. 2B-3

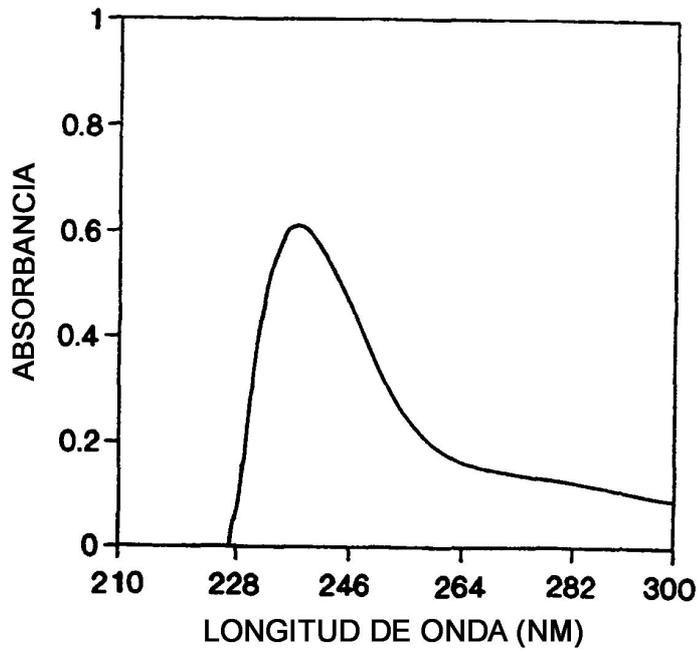


FIG. 2B-4

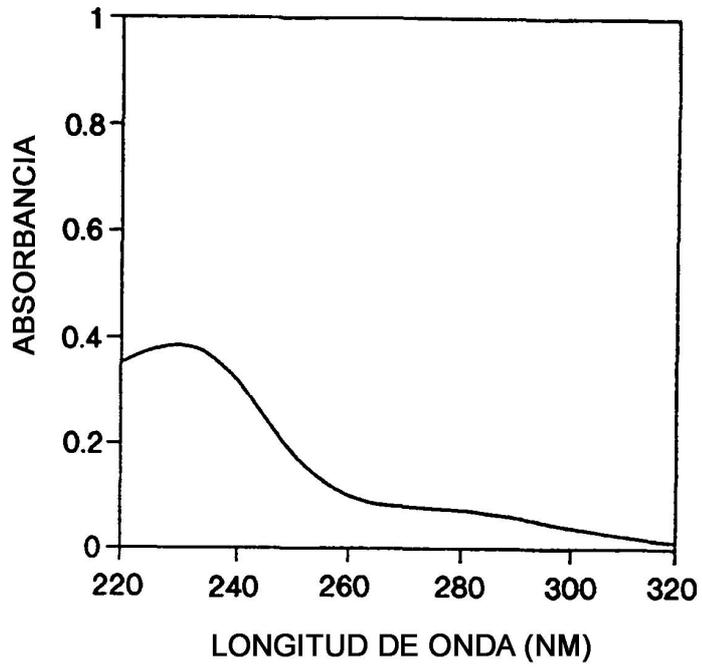


FIG. 3A

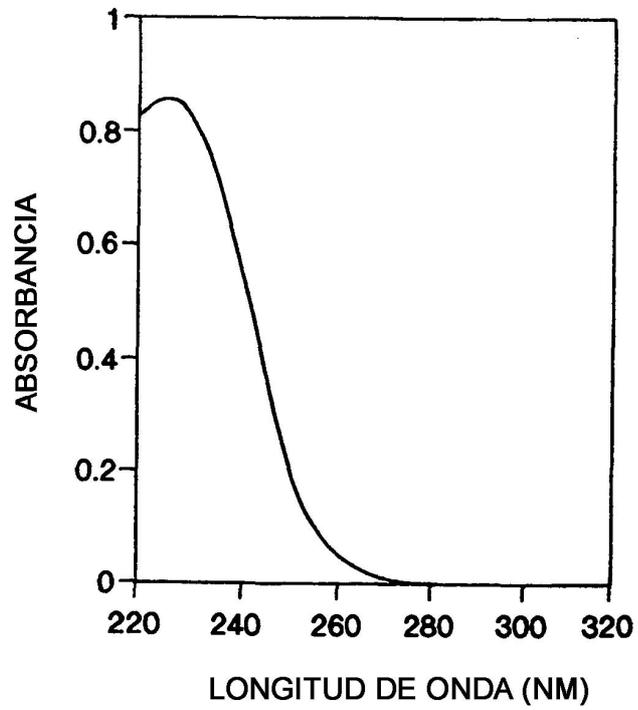


FIG. 3B

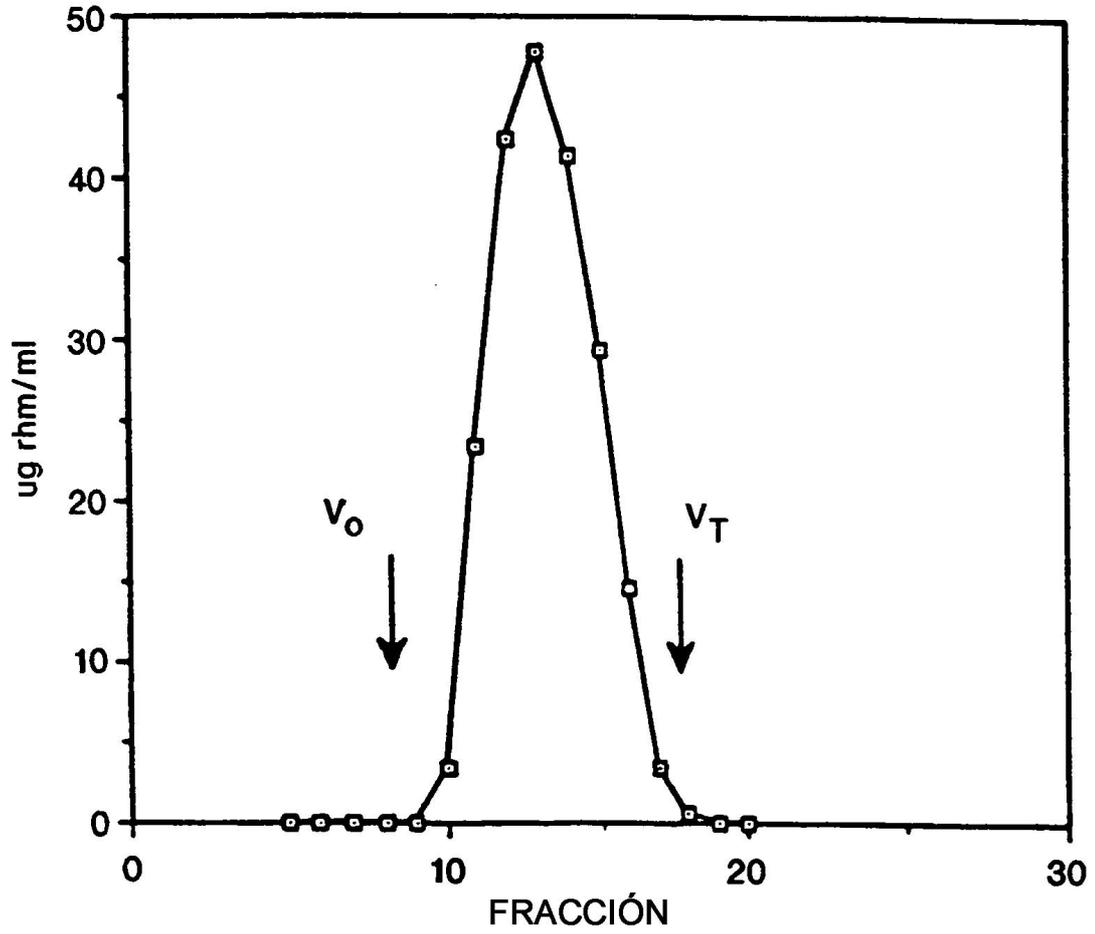


FIG. 4A

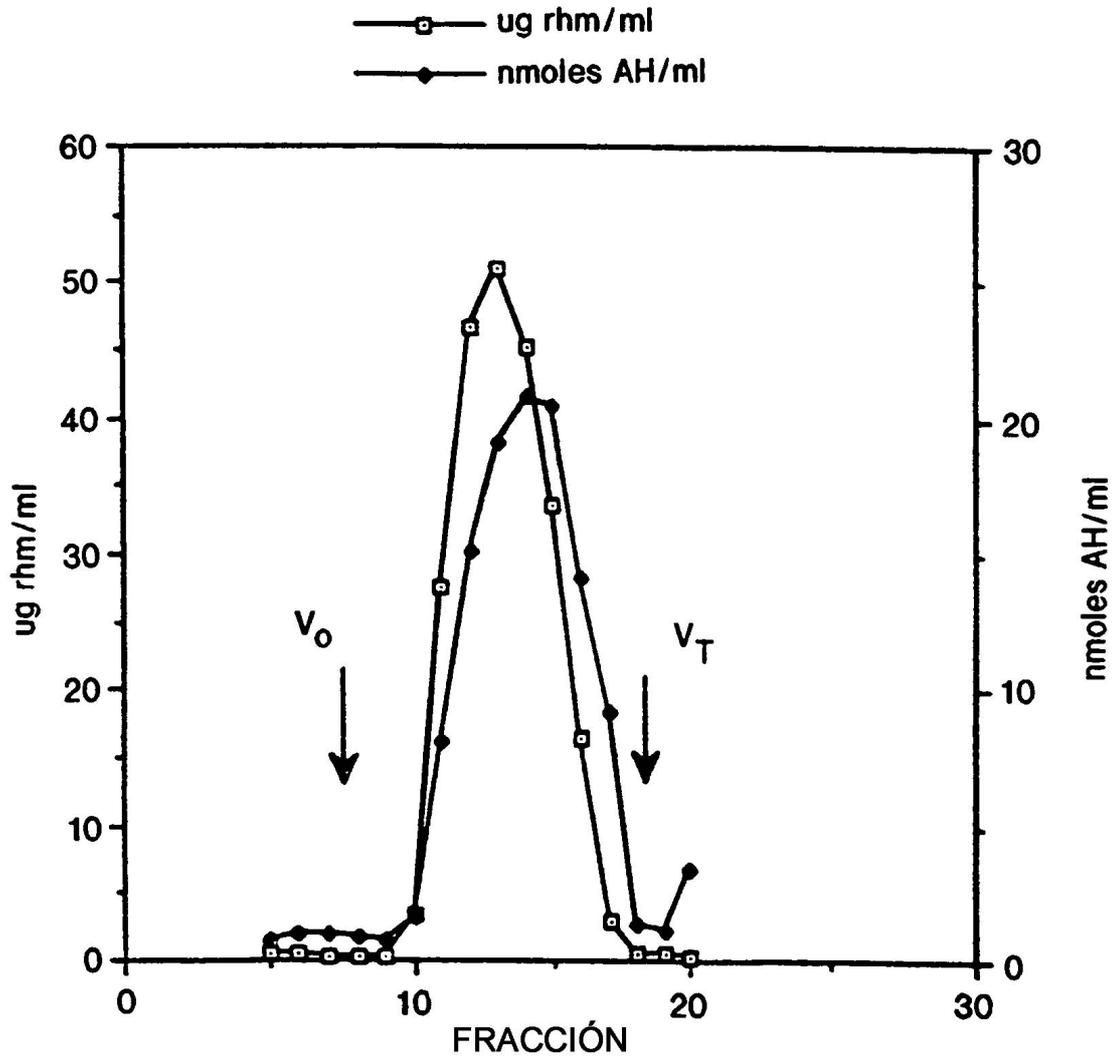


FIG. 4B

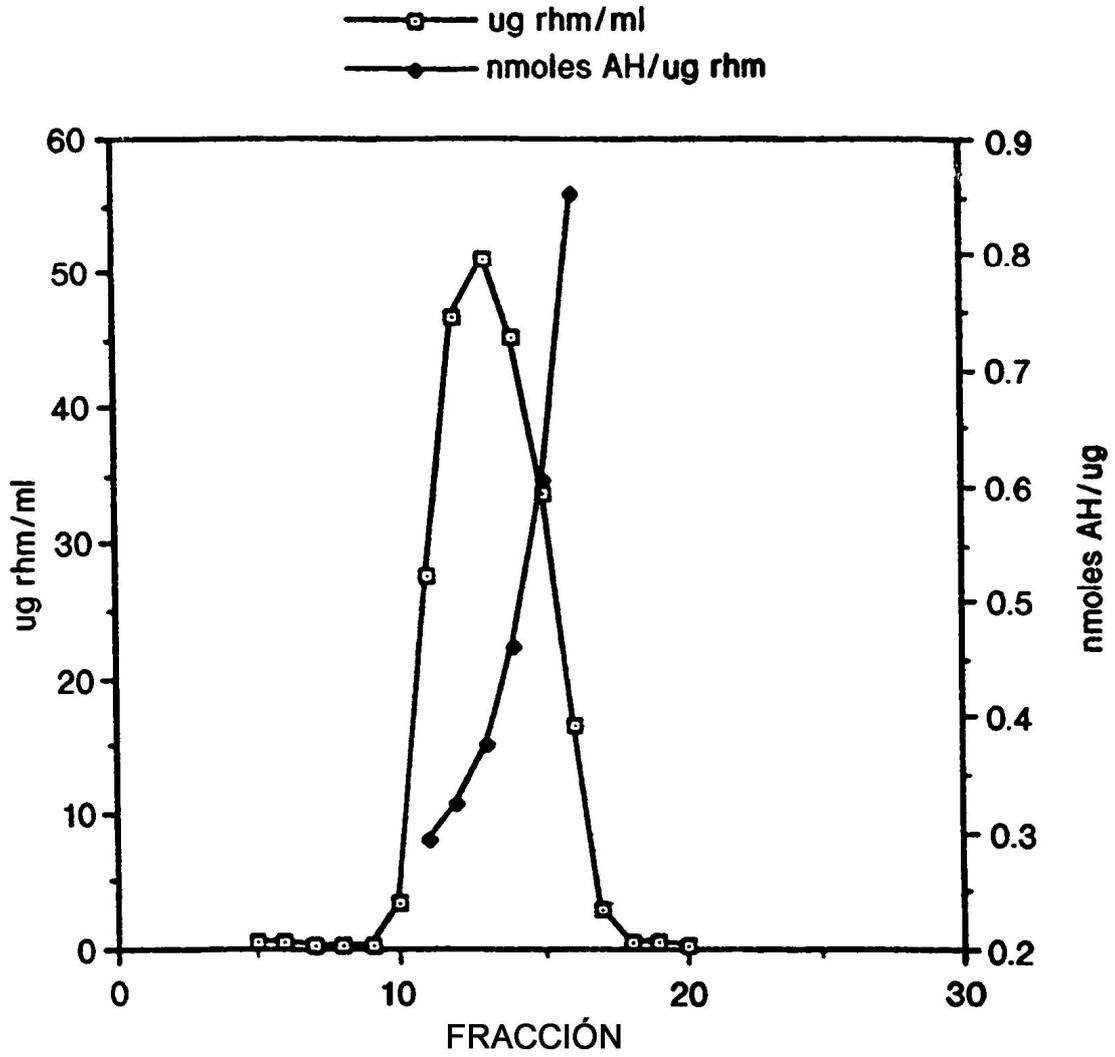


FIG. 4C