

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 153**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2007** **E 07734937 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012** **EP 2005165**

54 Título: **Separación de componentes conjutados y no conjutados**

30 Prioridad:

22.03.2006 GB 0605757

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)
VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA (SI), IT**

72 Inventor/es:

**BERTI, FRANCESCO;
GALLETTI, BRUNO;
PARENTE, PIERINO y
COSTANTINO, PAOLO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 153 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

Separación de componentes conjugados y no conjugados

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al análisis y control de calidad de vacunas que incluyen sacáridos (por ejemplo, sacáridos capsulares bacterianos), y especialmente aquellas en las que los sacáridos están conjugados con un vehículo. En particular, la invención es útil para el análisis y control de calidad de vacunas conjugadas que comprenden un conjugado de un sacárido que contiene un resto de ácido siálico, por ejemplo, un sacárido capsular bacteriano de *Streptococcus agalactiae* (también conocido como estreptococo de grupo B (GBS)).

Antecedentes de la invención

10 Son bien conocidos en la técnica inmunógenos que comprenden antígenos de sacáridos capsulares conjugados con proteínas vehículo. La conjugación convierte antígenos independientes de T en antígenos dependientes de T, potenciando de este modo las respuestas de memoria y permitiendo que se desarrolle inmunidad protectora, y la vacuna conjugada prototipo fue para *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib) [por ejemplo, véase el capítulo 14 de la referencia 1]. Como la vacuna Hib, se han desarrollado vacunas de sacárido conjugado para proteger contra

15 *Neisseria meningitidis* (meningococo) y contra *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Otros organismos donde las vacunas conjugadas son de interés son *Streptococcus agalactiae* (GBS) [2], *Pseudomonas aeruginosa* [3] y *Staphylococcus aureus* [4].

20 Las vacunas conjugadas para *N. meningitidis* del serogrupo C se han aprobado para uso humano, e incluyen Menjugate™ [5], Meningitec™ y NeisVac-C™. Se ha informado de mezclas de conjugados para cada uno de los serogrupos A, C, W135 e Y [por ejemplo, referencias 6-9], incluyendo el producto Menactra™. Otras mezclas de antígenos conjugados incluyen: (i) mezclas de meningococos A/C [10, 11]; (ii) el producto PrevNar™ [12] que contiene siete conjugados de neumococos; (iii) conjugados mixtos de meningococos y Hib [13, 14]; y (iv) conjugados de meningococos, neumococos y Hib combinados [15].

25 Los problemas cuando se trata con vacunas conjugadas incluyen la estabilidad y uniformidad lote a lote. En vacunas Hib, por ejemplo, se ha informado de la despolimerización catalítica del sacárido [16], y los conjugados de la cápsula de meningococos del serogrupo A se hidrolizan fácilmente [17]. La inestabilidad de los conjugados conduce indeseablemente a una reducción en la dosis eficaz del conjugado inmunogénico en el tiempo, variación entre lotes, y niveles aumentados de productos de descomposición no caracterizados. Las referencias 18 y 19 analizan cuestiones referentes al ensayo de estabilidad de vacunas conjugadas Hib.

30 Por consiguiente, tiene que controlarse la hidrólisis de los glucoconjugados en sacárido libre (es decir, no conjugado) en las vacunas formuladas solas o cuando están en combinación con otras vacunas. Este análisis requiere típicamente la separación de cualquier sacárido no conjugado del conjugado seguido por análisis cuantitativo de sacáridos. Los procedimientos conocidos de separación incluyen ultrafiltración, cromatografía hidrófoba y precipitación selectiva [20].

35 Un objeto de la invención es proporcionar modificaciones y mejoras en el control de calidad de vacunas conjugadas para evaluar su estabilidad e integridad. En particular, un objeto es proporcionar técnicas de separación mejoradas previas al análisis cuantitativo.

Divulgación de la invención

40 Los inventores han descubierto que los sacáridos conjugados pueden precipitarse selectivamente de los sacáridos no conjugados con un reactivo básico en condiciones básicas. En estas condiciones, el sacárido no conjugado permanece sustancialmente en el sobrenadante mientras que el sacárido conjugado precipita de forma sustancialmente completa, permitiendo de este modo una separación rápida y cuantitativa de estos sacáridos que puede explotarse en procedimientos analíticos para cuantificar un sacárido no conjugado. La referencia 20 describe la precipitación selectiva de sacáridos no conjugados libres de sacáridos conjugados en vacunas conjugadas de

45 polisacáridos de meningococo-toxoide diftérico usando desoxicolato/HCl en condiciones ácidas. Sin embargo, se ha descubierto que este enfoque está limitado, ya que los sacáridos capsulares bacterianos que contienen restos de ácido siálico, especialmente restos de ácido siálico terminales (por ejemplo, *Streptococcus agalactiae*) son susceptibles a hidrólisis en estas condiciones.

50 Los inventores también han descubierto que los sacáridos conjugados pueden precipitarse selectivamente del vehículo no conjugado usando el mismo reactivo y condiciones. Asimismo, el vehículo no conjugado permanece sustancialmente en el sobrenadante mientras que el sacárido conjugado precipita de forma sustancialmente completa, permitiendo de este modo una separación rápida y cuantitativa de estos componentes que puede explotarse en procedimientos analíticos para cuantificar un vehículo no conjugado (y por lo tanto puede usarse para cuantificar un sacárido no conjugado).

55

La invención supera las deficiencias de la técnica previa y proporciona una técnica rápida y cuantitativa para la separación de componentes no conjugados y conjugados. La invención es aplicable a una gama de vacunas conjugadas, incluyendo vacunas que comprenden sacáridos capsulares bacterianos que contienen un resto de ácido siálico y particularmente vacunas que comprenden el sacárido capsular de *Streptococcus agalactiae*.

- 5 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se emplea un reactivo básico en condiciones básicas para separar un sacárido conjugado de un componente no conjugado, como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para separar un componente de sacárido conjugado en una muestra de un componente no conjugado en la muestra, que comprende la etapa de poner en contacto la muestra con un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar selectivamente el componente de sacárido conjugado de la muestra, donde el componente de sacárido conjugado es un conjugado sacárido-vehículo unido covalentemente, el sacárido conjugado se precipita selectivamente del sacárido no conjugado con el reactivo básico en condiciones básicas, y las condiciones básicas son de pH 9 a 11. La invención también proporciona el uso de un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar selectivamente un componente de sacárido conjugado en una muestra de un componente no conjugado en la muestra, separando de este modo el componente de sacárido conjugado del componente no conjugado, donde el componente de sacárido conjugado es un conjugado sacárido-vehículo unido covalentemente, el sacárido conjugado se precipita selectivamente del sacárido no conjugado con el reactivo básico en condiciones básicas, y las condiciones básicas son de pH 9 a 11.

- En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar una muestra que comprende un componente de sacárido conjugado y un componente no conjugado para el análisis de su grado de no conjugación, que comprende la etapa de poner en contacto la muestra con un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar selectivamente el componente de sacárido conjugado de la muestra y obtener de este modo un sobrenadante que comprenda el componente no conjugado separado, donde el componente de sacárido conjugado es un conjugado sacárido-vehículo unido covalentemente, el sacárido conjugado se precipita selectivamente del sacárido no conjugado con el reactivo básico en condiciones básicas, y las condiciones básicas son de pH 9 a 11. La invención también proporciona un procedimiento para analizar el grado de no conjugación de una muestra que comprende un componente de sacárido conjugado y un componente no conjugado, que comprende las etapas de (i) poner en contacto la muestra con un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar selectivamente el componente de sacárido conjugado de la muestra y obtener de este modo un sobrenadante que comprenda el componente no conjugado separado y (ii) analizar el contenido del sobrenadante para dar el contenido no conjugado de la muestra, donde el componente de sacárido conjugado es un conjugado sacárido-vehículo unido covalentemente, el sacárido conjugado se precipita selectivamente del sacárido no conjugado con el reactivo básico en condiciones básicas, y las condiciones básicas son de pH 9 a 11.

- En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para proporcionar una vacuna para su distribución a y/o uso por médicos, que comprende las etapas de: (a) fabricar una vacuna que comprende un sacárido conjugado; (b) analizar el grado de la vacuna de no conjugación por un procedimiento de análisis de la invención; y, si los resultados de la etapa (b) indican un grado de no conjugación aceptable para uso clínico, (c) suministrar la vacuna para su uso por médicos. La etapa (b) puede implicar la evaluación de la concentración mínima de sacárido (por ejemplo, entre 1-20 μg de sacárido total), la evaluación de la proporción de sacárido no conjugado:conjugado (por ejemplo, $\leq 20\%$ del sacárido total en peso es sacárido no conjugado, preferiblemente $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, etc.). La etapa (b) puede realizarse en una vacuna envasada, o puede realizarse en una vacuna a granel antes de su envasado. Cuando la vacuna es una vacuna de combinación, la etapa (b) puede realizarse respecto a un tipo individual de sacárido o todos los tipos de sacárido.

Reactivo básico

- La expresión "reactivo básico" incluye reactivos capaces de formar una solución básica (es decir, $\text{pH} > 7$) al añadir agua. El reactivo básico puede ser una solución básica en sí misma (por ejemplo, una solución de sal básica), un reactivo sólido (por ejemplo, una sal básica), o un gas (por ejemplo, NH_3). El reactivo básico puede comprender un único reactivo, o una mezcla de reactivos, por ejemplo, una mezcla de soluciones básicas, o una mezcla de reactivos sólidos. Opcionalmente, el reactivo básico también puede comprender un tampón, para formar las condiciones de pH apropiadas al añadir el reactivo básico a la muestra.

- El reactivo básico típicamente comprende una base, que puede estar en estado sólido, gaseoso o acuoso, etc., según sea apropiado. Las bases preferidas son sales liotrópicas, por ejemplo, sulfatos, hidrogenofosfatos, acetatos, citratos o tartratos de amonio, potasio o sodio. Sales liotrópicas particularmente preferidas son sulfatos e hidrogenofosfatos de amonio y potasio, es decir, K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, K_2SO_4 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Una sal liotrópica particularmente preferida es K_2HPO_4 .

- Soluciones básicas de sales básicas son reactivos básicos preferidos. Se prefieren concentraciones de sal básica mayores de 1 M, siendo las soluciones saturadas (por ejemplo, de K_2HPO_4) particularmente preferidas. Cuando se usan soluciones básicas, el volumen de solución básica a la muestra es típicamente de 1:4 a 2:1, preferiblemente de 1:3 a 1,67:1, más preferiblemente de aproximadamente 1:1).

Condiciones básicas

La muestra se ponen en contacto con el reactivo básico en condiciones básicas, es decir, un pH final de pH 9 a 11, más preferiblemente de pH 9,5 a 9,9, aún más preferiblemente de aproximadamente pH 9,7.

5 Las condiciones básicas pueden conseguirse poniendo en contacto la muestra con el reactivo básico, opcionalmente en combinación con un tampón, en cantidades para obtener una concentración apropiada del reactivo básico, y el tampón opcional. El pH de la mezcla después del contacto dependerá de los pH iniciales de la muestra, el reactivo básico, y el tampón opcional. Cuando el reactivo básico es una solución acuosa, el pH del reactivo básico antes del contacto con la muestra es >7, preferiblemente de pH 8 a 12, más preferiblemente de pH 9 a 11, más preferiblemente de pH 9,5 a 10,5, aún más preferiblemente de pH 10 a 10,3. Preferiblemente, el pH del reactivo básico antes del contacto es mayor que el pH de la muestra antes del contacto. Un reactivo básico preferido es una solución saturada de K_2HPO_4 (pH 10,30). El pH de la muestra no es crítico para la invención, con la condición de que pueda ponerse en contacto suficiente reactivo básico, opcionalmente en combinación con un tampón, con la muestra para proporcionar condiciones básicas de pH 9 a 11. Preferiblemente, sin embargo, la muestra es aproximadamente neutra o básica, por ejemplo, que tiene un pH >6. Las vacunas conjugadas típicamente se tamponarán a aproximadamente pH neutro, por ejemplo, que tiene un pH de 6 a 8, preferiblemente aproximadamente 7,2. En una realización preferida de la invención, las condiciones básicas preferidas se proporcionan en combinación con el uso de un reactivo básico que comprende una sal monohidrogenofosfato, particularmente K_2HPO_4 . Las condiciones básicas de pH 9,5 a 9,9 en combinación con el uso de un reactivo básico que comprende K_2HPO_4 son especialmente preferidas, ya que los inventores han descubierto que esta combinación conduce a una precipitación selectiva particularmente eficaz de conjugados de *Streptococcus agalactiae* (GBS).

Tipos de componentes

El componente no conjugado es un componente de sacárido no conjugado o un componente de vehículo no conjugado, como se analiza en más detalle a continuación.

25 Por lo tanto, en los procedimientos de análisis de la invención, cuando el componente no conjugado es un componente de sacárido no conjugado, la etapa (ii) comprende analizar el contenido de sacárido del sobrenadante para dar el contenido de sacárido no conjugado de la muestra. Asimismo, cuando el componente no conjugado es un componente de vehículo no conjugado, la etapa (ii) comprende analizar el contenido de vehículo del sobrenadante para dar el contenido de vehículo no conjugado de la muestra. Opcionalmente, la invención puede comprender analizar tanto el contenido de sacárido como el contenido de vehículo del sobrenadante.

30 Grado de no conjugación

Un grado de no conjugación de la muestra puede evaluarse de varios modos, pero todos implican, directa o indirectamente, analizar un contenido de sacárido y/o vehículo no conjugado de la muestra. Puede analizarse absolutamente, por ejemplo, puede usarse directamente el contenido de sacárido y/o vehículo no conjugado directamente como una medición de un grado de no conjugación de la muestra. Como alternativa, puede analizarse 35 relativamente, por ejemplo, puede usarse la proporción de un contenido de sacárido no conjugado de la muestra a su contenido de sacárido total (es decir, no conjugado y conjugado), y/o la proporción de un contenido de vehículo no conjugado de la muestra a su contenido de vehículo total (es decir, no conjugado y conjugado), como medición de un grado de no conjugación de la muestra.

40 Típicamente, existe una relación entre el contenido de sacárido no conjugado y el contenido de vehículo no conjugado de una muestra, y el contenido de sacárido no conjugado puede determinarse a partir del contenido de vehículo no conjugado de una muestra, y viceversa. Por tanto, analizar el contenido de sacárido no conjugado de una muestra constituye un procedimiento de análisis del contenido de vehículo no conjugado de una muestra, y viceversa. Por ejemplo, esta relación puede usarse ventajosamente, por ejemplo, cuando se analiza una vacuna conjugada que comprende un único vehículo pero más de un tipo de sacárido. En lugar de analizar el grado de no 45 conjugación de cada tipo de sacárido en la vacuna, puede analizarse el grado de no conjugación del vehículo para dar un grado de no conjugación para la vacuna como conjunto, es decir, un grado promedio de no conjugación para todos los tipos de sacárido.

50 Cuando se evalúa un grado de no conjugación de la muestra, se prefiere que se analice directamente un contenido de sacárido y/o de vehículo no conjugado de la muestra. Sin embargo, puede analizarse indirectamente un grado de no conjugación de la muestra, por ejemplo, analizando un contenido de sacárido conjugado y/o vehículo conjugado de la muestra. El contenido de sacárido total = contenido de sacárido no conjugado + contenido de sacárido conjugado y el contenido de vehículo total = contenido de vehículo no conjugado + contenido de vehículo conjugado, y esta relaciones pueden explotarse para calcular la variable desconocida a partir de las dos variables conocidas. Por tanto, analizar el contenido de sacárido conjugado y el contenido de sacárido total indirectamente constituye un 55 procedimiento para analizar el contenido de sacárido no conjugado de una muestra; y analizar el contenido de vehículo conjugado y el contenido de vehículo total indirectamente constituye un procedimiento para analizar el contenido de vehículo no conjugado de una muestra.

Se prefiere el análisis directo del contenido de sacárido no conjugado y/o vehículo no conjugado ya que implica el análisis del sobrenadante en lugar del precipitado. Siendo un líquido, el sobrenadante generalmente es más adecuado para técnicas analíticas de vehículo y/o sacárido que el precipitado.

5 Preferiblemente, un grado de no conjugación de la muestra se evalúa analizando (preferiblemente de forma directa) un contenido de sacárido no conjugado de la muestra. En general, es deseable asegurar que una vacuna incluya <25% (por ejemplo, <20%, <15%, <10%, etc.) de cada tipo de sacárido en forma libre. Elevados niveles de sacárido libre significa una dosis inmunogénica inferior de conjugado.

10 El procedimiento de análisis comprende preferiblemente la etapa de medir el contenido de sacárido total y/o el contenido de vehículo total de la muestra. Típicamente, esta etapa implicará una etapa preparativa de dividir la muestra, analizándose una parte de la misma para el contenido de sacárido o vehículo no conjugado, analizándose otra parte para el contenido de sacárido o vehículo total.

15 Como alternativa, puede compararse el contenido de sacárido o vehículo no conjugado frente a un contenido de sacárido o vehículo total conocido o teórico de la muestra, o un contenido patrón de sacárido o vehículo de la muestra, según sea apropiado (por ejemplo, la cantidad calculada de sacárido o vehículo no conjugado presente después de un periodo de tiempo conocido), en lugar de medir el contenido de sacárido o vehículo total. En esta realización, por lo tanto, el procedimiento de análisis comprende la etapa de comparar el contenido de sacárido o vehículo no conjugado frente a un contenido de sacárido o vehículo total conocido o teórico de la muestra o un contenido patrón de sacárido o vehículo de la muestra.

Procedimientos de análisis de sacárido

20 Los procedimientos para analizar el contenido de sacárido no conjugado o conjugado típicamente requieren la separación del sacárido no conjugado del sacárido conjugado. Por consiguiente, los procedimientos analíticos de la invención típicamente comprenden las etapas de (i) una etapa de preparación inicial de poner en contacto la mezcla con un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar el componente de sacárido conjugado selectivamente de la muestra y obtener de este modo un sobrenadante que comprende el sacárido no conjugado separado, seguido de (ii) el análisis del contenido de sacárido del sobrenadante para dar el contenido de sacárido no conjugado de la muestra. La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar una muestra para el análisis realizando la etapa (i). Opcionalmente, después de la etapa (i), pero antes de la etapa (ii), la muestra puede centrifugarse y/o filtrarse.

Cálculo y medición

30 En general, las muestras pueden analizarse de varios modos usando la invención. El contenido de sacárido no conjugado puede medirse, por ejemplo, para comprobar la conjugación incompleta, o para seguir la hidrólisis del conjugado controlando la cantidad creciente de sacárido libre en el tiempo. Además, midiendo el contenido de sacárido total (es decir, no conjugado y conjugado) en una muestra, puede evaluarse la proporción de sacárido libre a sacárido total (si es necesario respecto a cada tipo de sacárido), que puede usarse para propósitos reguladores o de control de la calidad. En general, es deseable asegurar que una vacuna incluya <25% (por ejemplo, <20%, <15%, <10%, etc.) de cada tipo de sacárido en forma libre. Elevados niveles de sacáridos libres indican una dosis inmunogénica inferior de conjugado.

35 Como alternativa, o adicionalmente, para medir el contenido de sacárido no conjugado, también puede medirse el contenido de sacárido conjugado, por ejemplo, para comprobar la conjugación incompleta, o para seguir la hidrólisis del conjugado controlando la cantidad creciente de sacárido libre en el tiempo.

40 El procedimiento de análisis preferiblemente comprende la etapa de medir el contenido de sacárido total de la muestra. Típicamente, esta etapa implicará una etapa preparativa de dividir la muestra, analizándose una parte de la misma para el contenido de sacárido no conjugado, analizándose la otra parte para el contenido de sacárido total.

45 Como alternativa, el contenido de sacárido no conjugado puede compararse frente a un contenido de sacárido total conocido o teórico de la muestra o un contenido patrón de sacárido de la muestra (por ejemplo, la cantidad calculada de sacárido no conjugado presente después de un periodo de tiempo conocido), en lugar de medir el contenido de sacárido total. En esta realización, por lo tanto, el procedimiento de análisis comprende la etapa de comparar el contenido de sacárido no conjugado frente a un contenido de sacárido total conocido o teórico de la muestra o un contenido patrón de sacárido de la muestra.

Separación de diferentes tipos de sacárido

50 Los sacáridos conjugados en la muestra típicamente comprenden antígenos de sacárido conjugados con proteínas vehículo. Frecuentemente, los sacáridos derivados de un patógeno particular comprenden oligo o polisacáridos que tienen una distribución de longitudes. Los sacáridos que comprenden esta distribución están todos considerados del mismo "tipo". En una vacuna de combinación, por ejemplo, una vacuna de combinación que comprende una mezcla de sacáridos capsulares de meningococos de los serogrupos C, W135 e Y, la vacuna comprenderá un "tipo" de sacárido asociado con cada inmunógeno componente, por ejemplo, un tipo de sacárido asociado con inmunógenos

del serogrupo C, un tipo de sacárido asociado con inmunógenos del serogrupo W135 y un tipo de sacárido asociado con inmunógenos del serogrupo Y.

5 Los procedimientos de la invención separan sacáridos no conjugados y conjugados y generalmente no distinguen entre diferentes tipos de sacárido, separando de este modo el sacárido no conjugado y conjugado independientemente del tipo de sacárido.

10 Sin embargo, la medición del contenido de sacárido no conjugado de los tipos individuales de sacárido en una vacuna de combinación es no obstante posible. Ciertos procedimientos de análisis cuantitativo de glucoconjugado analizado en más detalle a continuación permiten la medición de tipos individuales de sacáridos dentro de vacunas combinadas de glucoconjugado que comprenden más de un tipo de inmunógeno glucoconjugado, incluso cuando diferentes sacáridos comparten unidades de monosacárido. Por consiguiente, los procedimientos de la invención permiten el análisis del contenido de sacárido conjugado de una vacuna individual o combinada y, respecto a una vacuna combinada que comprende más de un tipo de inmunógeno de glucoconjugado, para cada tipo individual de sacárido o para todos los tipos de sacárido.

Medición del contenido de sacárido de una composición

15 Como se ha mencionado anteriormente, además de medir el contenido de sacárido del sacárido no conjugado separado, el procedimiento de análisis de la presente invención puede incluir opcionalmente la etapa de medir el contenido de sacárido total (es decir, no conjugado y conjugado) de un tipo individual de sacárido o el contenido de todos los tipos de sacárido. El contenido de sacárido total puede medirse midiendo el contenido de sacárido de la muestra antes de la separación. Por tanto, la presente invención puede requerir la medición del contenido de sacárido del sacárido no conjugado separado y el sacárido total de la muestra antes, después o al mismo tiempo que la separación.

20 Los procedimientos para medir el contenido de sacárido de composiciones son bien conocidos en la técnica y técnicas típicas incluyen análisis colorimétricos, y cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC) en combinación con detección amperométrica pulsada (PAD).

25 Típicamente, el sacárido se trata para despolimerizar los sacáridos para dar sus monosacáridos constituyentes antes de analizar el contenido de monosacárido. El análisis del contenido de sacárido entonces puede proceder sobre la mezcla despolimerizada de monosacáridos liberados. Como el contenido de monosacárido está directamente relacionado con el contenido de sacárido en la composición a analizar antes de la despolimerización, el análisis del contenido de sacárido de monosacáridos despolimerizados permite la determinación del contenido de sacárido de la composición.

30 Las condiciones para la despolimerización del sacárido en sus monosacáridos constituyentes son bien conocidas en la técnica y típicamente comprenden hidrólisis ácida o básica.

35 Por ejemplo, el sacárido del serogrupo C puede hidrolizarse para el análisis del contenido de sacárido total por tratamiento con HCl 100 mM a 80°C durante 2 horas [21]. La hidrólisis ácida usando HCl también puede usarse para el sacárido Hib y el tratamiento típico implica la adición de TFA a una concentración final de 0,3 M y calentamiento a 100°C durante 2 horas. La hidrólisis ácida usando ácido trifluoroacético (TFA) puede usarse para la hidrólisis de todos los serogrupos C, W135 e Y, prefiriéndose una temperatura de incubación ligeramente inferior para el serogrupo C para evitar la degradación de su ácido siálico (90°C en lugar de 100°C). Un tratamiento con TFA típico implica la adición de TFA a una concentración final de 2 M, seguido por calentamiento a 90-100°C durante 90 minutos. La hidrólisis ácida usando TFA también puede usarse para la hidrólisis del polisacárido MenA y el tratamiento típico implica la adición de TFA a una concentración final de 2 M y calentamiento a 100°C durante 2 horas. La hidrólisis ácida usando TFA también puede usarse para la hidrólisis del sacárido Hib y el tratamiento típico implica la adición de TFA a una concentración final de 4 M y calentamiento a 100°C durante 2 horas [22]. La hidrólisis básica usando NaOH también puede usarse para la hidrólisis de sacárido Hib [22].

45 Los sacáridos GBS pueden despolimerizarse por hidrólisis en ácido suave o por calentamiento etc. Una hidrólisis ácida preferida es con ácido trifluoroacético 2 M a 100°C durante 2 horas [23]. Se ha informado de la despolimerización del sacárido capsular del serotipo III por endo- β -galactosidasa [24, 25, 26 y 27]. La ozonólisis de polisacáridos capsulares de los serotipos GBS II, III y VIII también se ha usado para la despolimerización [28].

50 Después de la despolimerización, los hidrolizados de sacárido pueden secarse, por ejemplo, usando una secadora de vacío.

55 Después de la despolimerización de una vacuna de combinación que comprende más de un tipo de inmunógeno de glucoconjugado, o el sacárido no conjugado separado de dicha vacuna combinada, la composición puede contener monosacáridos mezclados de diferentes tipos. Las cantidades de estos monosacáridos en la mezcla están directamente relacionadas con las cantidades de sacáridos en la composición prehidrólisis original, y esas cantidades de los sacáridos de partida pueden determinarse utilizando los procedimientos de la invención en el procedimiento para analizar el contenido de sacárido de una composición descrita en la referencia 29 y/o su solicitud de prioridad.

El progreso de la despolimerización (por ejemplo, para comprobar la hidrólisis total en monosacáridos en lugar de la hidrólisis parcial en oligosacáridos) puede comprobarse midiendo el grado de polimerización (DP) en una mezcla, usando técnicas conocidas, por ejemplo, RMN, espectrometría de masas, etc.

5 Una vez se ha despolimerizado el sacárido en monosacáridos, se cuantifican los monosacáridos. Por consiguiente, los procedimientos de análisis de la invención, por lo tanto, comprenden típicamente la etapa de cuantificar los monosacáridos obtenidos de la etapa de despolimerización.

10 Los procedimientos para cuantificar monosacáridos, incluyendo glucosa (por ejemplo, para el sacárido de *N. meningitidis* serogrupo Y), galactosa (por ejemplo, para el sacárido de *N. meningitidis* serogrupo W135 o un sacárido GBS), ácido siálico (por ejemplo, para el sacárido de *N. meningitidis* serogrupo C o un sacárido GBS), ribitol (por ejemplo, para un sacárido Hib) y manosamina-6-P (por ejemplo, para el sacárido *N. meningitidis* serogrupo C o un sacárido serogrupo A) son bien conocidos en la técnica.

15 Los procedimientos de cuantificación pueden ser directos o indirectos (por ejemplo, pueden implicar la derivatización de los monosacáridos seguido por un análisis que se correlaciona con el contenido de monosacárido original). Si fuera necesario, los procedimientos pueden implicar la separación de los diferentes monosacáridos entre sí, seguido por el análisis separado, y en dicho caso la medición real del contenido de monosacárido podría ser la misma en cada caso, surgiendo especificidad de la separación. Si se prefiere, sin embargo, usar procedimientos que puedan analizar los sacáridos en presencia de los otros, de modo que no tengan que separarse entre sí antes del análisis. Además, los procedimientos pueden usarse para sacáridos conjugados en los que, después de la desconjugación, el vehículo y el sacárido no tienen que separarse. Un procedimiento preferido es cromatografía aniónica, y en particular
20 cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC), en particular con detección amperométrica pulsada (PAD) [30, 31]. Se proporcionan sistemas HPAEC-PAD por Dionex™ Corporation (Sunnyvale, CA) por ejemplo, el sistema BioLC™, usando una columna tal como PA1 [sustrato de poliestireno al 2% con diámetro de 10 μm reticulado con divinilbenzeno, aglomerado con látex funcionalizado de amonio cuaternario MicroBead de 500 nm (al 5% reticulado)] o PA10 [sustrato de etilvinilbenzeno al 55% de diámetro 10 μm reticulado con divinilbenzeno, aglomerado con ión amonio cuaternario difuncional MicroBead de 460 nm (al 5% reticulado)]. Estos sistemas pueden analizar cuantitativamente sacáridos individuales con mezclas sin la necesidad de derivatización o separación preanálisis. Para el análisis de sacárido, puede desearse filtrar otros compuestos antes de introducirlos en la columna, y Dionex™ produce trampas y protecciones para este propósito, por ejemplo, una trampa amino para retirar los aminoácidos, una trampa borato, etc.

30 Un procedimiento alternativo para cuantificar monosacáridos dentro de una mezcla despolimerizada es resonancia magnética nuclear (RMN). Por facilidad de uso y elevada sensibilidad, sin embargo, se prefieren los procedimientos cromatográficos de la invención.

35 Un procedimiento adicional para cuantificar monosacáridos es por colorimetría, por ejemplo, como se describe en las referencias 22; 32 y 94. Sin embargo, se ha descubierto que los procedimientos de la invención que emplean un reactivo básico que comprende sulfato de amonio son incompatibles con cuantificación colorimétrica. Preferiblemente, por lo tanto, cuando se usa un ensayo colorimétrico (por ejemplo, para analizar el contenido de sacárido), el reactivo básico no comprende sulfato de amonio, y preferiblemente no comprende una sal amonio.

Una vez se ha determinado el contenido de monosacárido, es sencillo calcular la cantidad de sacáridos en la composición original.

40 El procedimiento de la invención es típicamente destructivo. En lugar de realizar el procedimiento sobre una composición completa, por lo tanto, es más típico tomar una muestra de una composición de interés y después realizar el análisis sobre la muestra.

Procedimientos de análisis de vehículo

45 Los procedimientos para analizar el contenido de vehículo no conjugado o conjugado típicamente requieren la separación del vehículo no conjugado del vehículo conjugado. Por consiguiente, los procedimientos analíticos de la invención típicamente comprenden las etapas de (i) una etapa de preparación inicial de poner en contacto la muestra con un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar el componente de vehículo conjugado selectivamente de la muestra y obtener de este modo un sobrenadante que comprende el vehículo no conjugado separado, seguido de (ii) analizar el contenido de vehículo del sobrenadante para dar el contenido de vehículo no
50 conjugado de la muestra. La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar una muestra para el análisis realizando la etapa (i). Opcionalmente, después de la etapa (i), pero antes de la etapa (ii), puede centrifugarse y/o filtrarse la muestra.

Cálculo y medición

55 En general, las muestras pueden analizarse de varios modos usando la invención. El contenido de sacárido no conjugado puede medirse, por ejemplo, para comprobar la conjugación incompleta, o para seguir la hidrólisis del conjugado controlando la cantidad creciente de vehículo libre en el tiempo. Además, midiendo el contenido de sacárido total (es decir, no conjugado y conjugado) en una muestra, puede evaluarse la proporción de vehículo libre

a vehículo total (si fuera necesario respecto a cada tipo de sacárido), que puede usarse para propósitos reguladores o de control de la calidad. En general, es deseable asegurar que una vacuna incluya <25% (por ejemplo, <20%, <15%, <10%, etc.) de cada tipo de vehículo en forma libre. Elevados niveles de vehículos libres indican una dosis inmunogénica inferior de conjugado.

- 5 Como alternativa, o adicionalmente, para medir el contenido de vehículo no conjugado, puede también medirse el contenido conjugado, por ejemplo, para comprobar la conjugación incompleta, o para seguir la hidrólisis del conjugado controlando la cantidad creciente de vehículo libre en el tiempo. Como el contenido de vehículo total = contenido de vehículo no conjugado + contenido de vehículo conjugado, es posible calcular el contenido de sacárido vehículo midiendo el contenido de sacárido vehículo y el contenido de vehículo total. Por tanto, medir el contenido de
- 10 vehículo no conjugado y el contenido de vehículo total constituye un procedimiento para analizar el contenido de vehículo conjugado de una muestra.

El procedimiento de análisis preferiblemente comprende la etapa de medir el contenido de vehículo total de la muestra. Típicamente, esta etapa implicará una etapa preparativa de dividir la muestra, analizándose una parte de la misma para el contenido de vehículo no conjugado, analizándose la otra parte para el contenido de vehículo total.

- 15 Como alternativa, el contenido de vehículo no conjugado puede compararse frente a un contenido de vehículo total conocido o teórico de la muestra o un contenido patrón de vehículo de la muestra (por ejemplo, la cantidad calculada de vehículo no conjugado presente después de un periodo de tiempo conocido), en lugar de medir el contenido de vehículo total. En esta realización, por lo tanto, el procedimiento de análisis comprende la etapa de comparar el contenido de vehículo no conjugado frente a un contenido de vehículo total conocido o teórico de la muestra o un
- 20 contenido patrón de vehículo de la muestra.

Medición del contenido de vehículo de una composición

- Como se ha mencionado anteriormente, además de medir el contenido de vehículo del vehículo no conjugado separado, el procedimiento de análisis de la presente invención puede incluir opcionalmente la etapa de medir el contenido de vehículo total (es decir, no conjugado y conjugado). El contenido de vehículo total puede medirse
- 25 midiendo el contenido de vehículo de la muestra antes de la separación. Por tanto, la presente invención puede requerir la medición del contenido de vehículo del vehículo no conjugado separado y el vehículo total de la muestra antes, después o al mismo tiempo que la separación.

- Los procedimientos para medir el contenido de vehículo de composiciones son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se analiza en la referencia 33. Técnicas típicas para medir la cantidad de vehículos proteicos incluyen el ensayo de ácido bicinonínico (BCA), el ensayo de Bradford, el ensayo de Lowry, ensayos de absorbancia UV, inmunoensayos (por ejemplo, ELISA, RIA, etc.), y ensayos de tinción.
- 30

El procedimiento de la invención típicamente es destructivo. En lugar de realizar el procedimiento sobre una composición completa, por lo tanto, es más típico tomar una muestra de una composición de interés y después realizar el análisis sobre la muestra.

35 *Precipitación*

- No es crítico para la invención si cualquier componente que no sea los componentes de sacárido o vehículo de la muestra precipita o queda en el sobrenadante. Además, cuando la invención se refiere al análisis solamente de sacárido, no es crítico para la invención si cualquier componente no sacárido de la muestra precipita o queda en el sobrenadante. Asimismo, cuando la invención se refiere al análisis solamente de vehículo, no es crítico para la
- 40 invención si cualquier componente no vehículo de la muestra precipita o queda en el sobrenadante. Siempre que el componente no conjugado de interés y el componente conjugado acaben separados entre sí, entonces el componente no conjugado se considera que se ha separado del componente conjugado, independientemente de cuál de los componentes se mueva, cuál esté presente en el sobrenadante o cuál esté presente en el precipitado, e independientemente de si cualquiera de los componentes está separado con otros componentes.

- 45 Las técnicas para la separación de precipitado del sobrenadante son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, filtración o centrifugación.

Análisis de componentes no sacáridos

- Así como el análisis del contenido de vehículo en una composición, el procedimiento de análisis puede incluir el análisis de otros componentes o propiedades, por ejemplo, osmolalidad, pH, grado de polimerización para sacáridos
- 50 individuales o conjugados, contenido de sacárido, contenido de aluminio, contenido de detergente, contenido de conservante, etc.

Etapas adicionales

Puede ser deseable eliminar al menos algún compuesto no sacárido o no vehículo de la muestra antes de la etapa de separación de los componentes conjugados y no conjugados. Por ejemplo, cuando la vacuna se formula con

adyuvantes que contienen aluminio, típicamente puede aplicarse extracción en fase sólida al sobrenadante, por ejemplo, después de centrifugación.

Después del análisis del contenido de sacárido o vehículo, la invención puede incluir la etapa adicional de determinar una característica de un sacárido, por ejemplo, su DP (típicamente una DP promedio), su peso molecular, su pureza, etc.

Tras los detectores amperométricos y espectroscópicos, puede acoplarse el sacárido no conjugado o conjugado separado en un espectrómetro de masas, por ejemplo, FAB/EM o IEN/EM.

Preparación y almacenamiento de vacunas

La invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de vacuna, que comprende una etapa de análisis de una muestra de acuerdo con la invención, incluyendo una etapa de medición del pH, seguida por una etapa de ajuste del pH de la composición a un valor deseado, por ejemplo, entre 6 y 8, o aproximadamente 7.

La invención proporciona un procedimiento para envasar una vacuna, que comprende las etapas de: (a) fabricar una vacuna a granel que contiene un sacárido conjugado; (b) analizar el contenido de sacárido no conjugado en la vacuna a granel por un procedimiento de análisis de la invención; (c) opcionalmente, analizar la vacuna a granel para el pH y/u otras propiedades; y, si los resultados de la etapa (b) y (c) indican que la vacuna a granel es aceptable para uso clínico, (d) preparar y envasar la vacuna para uso humano a partir de la masa a granel. La etapa (c) puede implicar (véase anteriormente) la evaluación de la concentración mínima de sacárido, la evaluación de la proporción de sacárido no conjugado:conjugado, etc. La etapa (d) puede implicar el envase en forma monodosis o en forma multidosis, por ejemplo, en viales o en jeringas. Una dosis humana típica para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

La invención también proporciona un procedimiento para envasar una vacuna, que comprende las etapas de: (a) fabricar una vacuna a granel que contiene un sacárido conjugado; (b) analizar el contenido de vehículo no conjugado en la vacuna a granel por un procedimiento de análisis de la invención; (c) opcionalmente, analizar la vacuna a granel para el pH y/u otras propiedades; y, si los resultados de la etapa (b) y (c) indican que la vacuna a granel es aceptable para uso clínico, (d) preparar y envasar la vacuna para uso humano a partir de la masa a granel. La etapa (c) puede implicar (véase anteriormente) la evaluación de la concentración mínima de vehículo, la evaluación de la proporción de vehículo no conjugado:conjugado, etc.

En estos procedimientos para envasar una vacuna, la etapa (d) puede implicar el envase en forma monodosis o en forma multidosis en viales o en jeringas. Una dosis humana típica para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

La etapa (c) y/o (d) de los procedimientos para envasado pueden estar precedidas por la mezcla de la vacuna a granel con uno o más antígenos adicionales, por ejemplo, con

- un antígeno de sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*.
- un antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*.
- un antígeno de sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis*.
- un antígeno de sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis*.
- un antígeno proteico del serogrupo B de *N. meningitidis*
- preparaciones de microvesículas de *N. meningitidis* serogrupo B [34], "OMV nativos" [35], ampollas o vesículas de membrana externa [por ejemplo, ref. 36 a 41 etc.].
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b
- un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, tal como antígenos de sacárido conjugado polivalente [por ejemplo, ref. 42 a 44].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, 45, 46].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ejemplo, 46, 47].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina pertussis (PT) hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, ref. 48 y 49]. Pueden usarse antígenos pertussis celulares.
- un antígeno diftérico, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 13 de la ref. 1] por ejemplo, el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo, 50].
- un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 27 de la ref. 1].
- antígeno(s) de la polio [por ejemplo, 51, 52], tal como IPV.

Dichos antígenos pueden adsorberse a un adyuvante de sal de aluminio (por ejemplo, un hidróxido o un fosfato). Cualquier antígeno de sacárido adicional se incluye preferiblemente en forma de conjugados.

Muestras

La invención es particularmente útil para analizar el contenido de sacárido no conjugado o conjugado de una muestra (por ejemplo, una vacuna) o para preparar una muestra para el análisis del contenido de sacárido no conjugado de una muestra (por ejemplo, una vacuna). No es esencial para esta realización que la invención

contenga ningún sacárido no conjugado o conjugado ya que la invención puede emplearse de forma útil para determinar la presencia o ausencia de sacárido no conjugado o conjugado. Además, una etapa para analizar el contenido de sacárido de una muestra de un espécimen que conduce a un resultado negativo, es decir, la ausencia de sacárido, aún es una etapa para analizar el contenido de sacárido de una muestra o espécimen.

- 5 Sin embargo, se prefiere que la muestra sea sospechosa de contener (y preferiblemente contenga) sacárido conjugado o sacárido no conjugado. Es más preferido que la muestra contenga sacárido conjugado y sea sospechosa de contener (y preferiblemente contenga) sacárido no conjugado.

La presente invención, sin embargo, generalmente es más útil para separar sacárido conjugado de sacárido no conjugado en una muestra (por ejemplo, una vacuna). En esta realización, la muestra contiene preferiblemente tanto sacárido conjugado como sacárido no conjugado.

La muestra generalmente estará en solución acuosa.

Además de contener sacáridos, las muestras a analizar pueden incluir otros materiales. Estos pueden precipitar o no. Típicamente dichos componentes no precipitarán.

15 El analito de muestra puede ser un producto a ensayar antes de suministrarlo (por ejemplo, durante la fabricación o el ensayo de control de calidad), o puede ser un producto a ensayar después de suministrarlo (por ejemplo, para evaluar la estabilidad, vida útil, etc.).

Las muestras preferidas son vacunas de glucoconjugado, que pueden ser sencillas o combinadas (por ejemplo, una vacuna de glucoconjugado combinada que comprende más de un tipo de inmunógeno glucoconjugado). Las muestras particularmente preferidas son vacunas de glucoconjugado que comprenden un conjugado que comprende un sacárido que contiene un resto de ácido siálico, por ejemplo, un sacárido capsular bacteriano de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B).

Conjugados

Los sacáridos conjugados son conjugados sacárido-vehículo unidos covalentemente. La conjugación covalente se usa para potenciar la inmunogenicidad de los sacáridos convirtiéndolos de antígenos T independientes en antígenos T dependientes, permitiendo de este modo la sensibilización de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida [por ejemplo, revisada en las ref. 53 a 62]. Los sacáridos pueden unirse a vehículos (por ejemplo, proteínas) directamente [63, 64], pero generalmente se usa un enlazador o espaciador, por ejemplo, ácido adípico, β -propionamido [65], nitrofeniletilamina [66], haluros de haloacilo [67], enlaces glucosídicos [68], ácido 6-aminocaproico [69], ADH [70], restos C₄ a C₁₂ [71], etc.

30 Proteínas vehículo en conjugados

Las proteínas vehículo típicas en conjugados son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoide diftérico o toxoide tetánico. El derivado de toxina diftérica CRM₁₉₇ [72-74] es la proteína vehículo en Menjugate™ y Meningitec™, mientras que el toxoide tetánico se usa en NeisVac™. El toxoide diftérico se usa como vehículo en Menactra™. Otras proteínas vehículo conocidas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [75], péptidos sintéticos [76, 77], proteínas de choque térmico [78, 79], proteínas pertussis [80, 81], citoquinas [82], linfocinas [82], hormonas [82], factores de crecimiento [82], albúmina sérica humana (preferiblemente recombinante), proteínas artificiales que comprenden epítopes múltiples de células T CD4⁺ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [83] (por ejemplo, N19 [84]), proteína D de *H. influenzae* [85, 86], proteína superficial PspA de neumococos [87], proteínas de captación de hierro [88], toxina A o B de *C. difficile*. [89], una proteína GBS (particularmente GBS67 o GBS80), etc. Las composiciones pueden usar más de una proteína vehículo, por ejemplo, para reducir el riesgo de supresión del vehículo, una proteína vehículo individual puede portar más de un antígeno sacárido [90]. Los conjugados generalmente tienen una proporción de sacárido:proteína (p/p) entre 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido).

Sacáridos en conjugados

45 Los sacáridos conjugados pueden ser polisacáridos (por ejemplo, con un grado de polimerización de <10, por ejemplo 20, 30, 40, 50, 60 o más) u oligosacáridos (por ejemplo, con un grado de polimerización de 4 a 10). Los oligosacáridos pueden ser el resultado de despolimerización y/o hidrólisis de un polisacárido precursor por ejemplo, el analito puede ser un fragmento que contiene sacárido de un sacárido más grande. Los sacáridos conjugados preferidos son sacáridos capsulares.

50 Sacáridos conjugados incluso más preferidos son sacáridos capsulares bacterianos por ejemplo, de *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, B, C, W135 o Y), *Streptococcus pneumoniae* (serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, o 23F), *Streptococcus agalactiae* (tipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, u VIII), *Haemophilus influenzae* (cepas tipificables: a, b, c, d, e o f), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, etc.

La cápsula de *N. meningitidis* serogrupo A es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-ligado.

La cápsula de *N. meningitidis* serogrupo B es un homopolímero de ácidos siálicos ($\alpha 2 \rightarrow 8$) ligados.

El sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico (ácido N-acetil neuramínico, o "NeuNAc") ($\alpha 2 \rightarrow 9$)-ligado. La mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o C-8 de los restos de ácido siálico, pero aproximadamente el 15% de los aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo [91, 92]. La acetilación no parece afectar a la eficacia protectora (por ejemplo, a diferencia del producto Menjugate™, el producto NeisVac-C™ usa un sacárido des-O-acetilado, pero ambas vacunas son eficaces).

El sacárido de *N. meningitidis* del serogrupo W135 es un polímero de unidades del disacárido ácido siálico-galactosa [$\rightarrow 4$]-D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow)]. Como el sacárido del serogrupo C, tiene O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [93].

El sacárido de *N. meningitidis* del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto en que la unidad repetitiva disacárida incluye glucosa en lugar de galactosa [$\rightarrow 4$]-D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow)]. Como el sacárido del serogrupo W135, tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [93].

El sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B es un polímero de ribosa, ribitol, y fosfato ['PRP', (poli-3- β -D-ribosa-(1,1)-D-ribitol-5-fosfato)].

El sacárido capsular de *S. agalactiae* (GBS) está unido covalentemente a la estructura peptidoglicano de GBS, y es distinto del antígeno del grupo B, que es otro sacárido que está unido a la estructura peptidoglicano.

Los polisacáridos capsulares GBS están químicamente relacionados, pero son antigénicamente muy diferentes. Todos los polisacáridos capsulares GBS comparten el siguiente núcleo trisacárido:



Los diversos serotipos GBS difieren en la medida en que este núcleo está modificado. La diferencia entre los serotipos Ia y III, por ejemplo, surge del uso de GlcNAc (Ia) o Gal (III) en el núcleo para ligar núcleos trisacáridos consecutivos (Figura 1). Los serotipos Ia y Ib tienen ambos un disacárido [α -D-NeupNAc(2 \rightarrow 3) β -D-Galp-(1 \rightarrow)] unido a GlcNAc en el núcleo, pero el enlace es 1 \rightarrow 4 (Ia) o 1 \rightarrow 3 (Ib).

La enfermedad relacionada con GBS surge principalmente de los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, y VIII, estando más del 90% causada por cinco serotipos: Ia, Ib, II, III y V. La muestra preferiblemente comprende un sacárido de uno de estos cinco serotipos. Como se muestra en la Figura 2, los sacáridos capsulares de cada uno de estos cinco serotipos incluyen: (a) un resto N-acetil-neuramínico (NeuNAc) terminal (habitualmente mencionado como ácido siálico), que en todos los casos está unido 2 \rightarrow 3 a un resto de galactosa; y (b) un resto de N-acetilglucosamina (GlcNAc) dentro del núcleo trisacárido.

Los cinco sacáridos incluyen restos de galactosa dentro del núcleo trisacárido, pero los serotipos Ia, Ib, II y III también contienen restos de galactosa adicionales en cada unidad de repetición, conteniendo el sacárido del serotipo II tres restos de galactosa por unidad de repetición.

Es particularmente preferido que la muestra comprenda un sacárido GBS de los serotipos Ia, Ib o III.

Los sacáridos conjugados preferidos son sacáridos que contienen un resto de ácido siálico, preferiblemente un resto de ácido siálico terminal (por ejemplo, sacárido capsular GBS, sacárido de *N. meningitidis* del serogrupo B, sacárido de *N. meningitidis* del serogrupo C, sacárido de *N. meningitidis* del serogrupo W135, sacárido de *N. meningitidis* del serogrupo Y, sacárido de *E. coli* K 1, y algunos sacáridos de cepas de *Haemophilus*).

Además de ser útil para analizar sacáridos capsulares de longitud completa, la invención también puede usarse con fragmentos oligosacáridos de los mismos.

Otros sacáridos en conjugados pueden incluir glucanos (por ejemplo, glucanos fúngicos, tales como aquellos de *Candida albicans*), y sacáridos capsulares fúngicos, por ejemplo, de la cápsula de *Cryptococcus neoformans*. Otros antígenos de sacárido conjugado preferidos son sacáridos eucariotas, por ejemplo, sacáridos fúngicos, sacáridos vegetales, sacáridos humanos (por ejemplo, antígenos del cáncer), etc. Otros sacáridos conjugados son lipopolisacáridos y lipooligosacáridos.

Se prefieren sacáridos conjugados que están cargados (por ejemplo, aniónicos) a pH neutro. Sacáridos con múltiples grupos fosfato y/o múltiples grupos carboxilato pueden analizarse usando los procedimientos de la invención. La invención por tanto es particularmente útil para analizar muestras que comprenden sacáridos polianiónicos.

Vacunas

Ejemplos preferidos usados en la presente invención son vacunas que comprenden sacárido conjugado.

Vacunas conjugadas preferidas comprenden inmunógenos que protegen contra:

- *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib);
- 5 - *Neisseria meningitidis* (meningococos) de los serogrupos A, C, W135 y/o Y;
- *Streptococcus pneumoniae* (neumococos) de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.
- *Streptococcus agalactiae* (estreptococos de grupo B) de los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, y/o especialmente de los serotipos Ia, Ib, II, III y/o V;
- *Pseudomonas aeruginosa*; o
- 10 - *Staphylococcus aureus*,

individualmente o en combinación.

Vacunas conjugadas particularmente preferidas comprenden inmunógenos que protegen contra *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B).

Vacunas conjugadas de combinación preferidas comprenden:

- 15 - mezclas de conjugados de cada uno de los serogrupos de meningococos C e Y;
- mezclas de conjugados de cada uno de los serogrupos de meningococos C, W135 e Y;
- mezclas de conjugados de cada uno de los serogrupos de meningococos A, C, W135 e Y;
- mezclas de conjugados de los serogrupos de meningococos A y C;
- mezclas de conjugados de neumococos;
- 20 - conjugados mixtos de meningococos y Hib (por ejemplo, mezclas de conjugados Hib y conjugados de cada uno de los serogrupos de meningococos A y C, o mezclas de conjugados Hib y conjugados de cada uno de los serogrupos de meningococos C e Y); o
- conjugados combinados de meningococos, neumococos y Hib.

Además del conjugado, la vacuna puede contener uno o más de:

- 25 - un antígeno proteico del serogrupo B de *N. meningitidis*;
- preparaciones de vesículas preparadas a partir de *N. meningitidis* serogrupo B;
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, 45, 46];
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ejemplo, 46, 47];
- 30 - un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3. En su lugar pueden usarse antígenos pertussis celulares;
- un antígeno diftérico, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 13 de la ref. 1];
- un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 27 de la ref. 1]; o
- antígeno(s) de la polio, por ejemplo, IPV.

- 35 Dichos antígenos pueden adsorberse a un adyuvante de sal de aluminio (por ejemplo, un hidróxido o un fosfato). Cualquier antígeno sacárido adicional se incluye preferiblemente en forma de conjugados.

Uso de la invención en la producción y control de calidad de vacunas

- 40 La invención también proporciona un procedimiento para controlar la estabilidad de una vacuna en almacenamiento, que comprende las etapas de: (a) analizar la vacuna como se describe en este documento; y, si los resultados de la etapa (a) indican que la vacuna es aceptable para uso clínico, por ejemplo, es de un contenido de sacárido o vehículo no conjugado adecuado, (b) o (i) se prosigue hasta el almacenamiento de la vacuna o (ii) se suministra la vacuna para su uso por médicos. La etapa (a) puede realizarse en una vacuna envasada, en una vacuna a granel antes de su envase, sobre sacáridos antes de la conjugación; etc.

- 45 El procedimiento de análisis de la invención también permite la comparación de la misma vacuna en diferentes condiciones, o diferentes vacunas en las mismas condiciones.

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para comparar diferentes vacunas, que comprende las etapas de: (a) tratar una pluralidad de diferentes vacunas en condiciones ambientales sustancialmente idénticas; (b) analizar las vacunas tratadas como se describe en este documento; (c) comparar los resultados de la etapa (b); y, opcionalmente, (d) seleccionar una vacuna, por ejemplo, una vacuna estable en al menos una condición ambiental de la pluralidad de diferentes vacunas. La etapa (d) puede, por ejemplo, comprender la selección de la vacuna más estable en la al menos una condición ambiental. Por tanto, usos para este procedimiento incluyen comparar la estabilidad de diferentes vacunas, por ejemplo, en condiciones de almacenamiento. La condición ambiental puede ser una condición química (por ejemplo, exposición a un componente químico, por ejemplo, un disolvente, vehículo, etc.), pH, temperatura, humedad, etc. o una combinación de las mismas. La pluralidad de diferentes vacunas puede diferir típicamente en su composición, por ejemplo, longitud del sacárido, enlazador entre el sacárido y el vehículo, el vehículo, presencia de otros componentes de vacuna, concentración de componentes, excipientes, adyuvantes, pH, osmolaridad, fuerza iónica, etc.

La invención también proporciona un procedimiento para comparar el efecto de diferentes condiciones ambientales sobre una vacuna, que comprende las etapas de: (a) tratar una pluralidad de muestras sustancialmente idénticas de una vacuna en una pluralidad de diferentes condiciones ambientales; (b) analizar las muestras tratadas como se describe en este documento; y (c) comparar los resultados de la etapa (b); y, opcionalmente, (d) seleccionar una condición ambiental, por ejemplo, una condición ambiental en la que la vacuna es estable de la pluralidad de diferentes condiciones ambientales. La etapa (d) puede, por ejemplo, comprender la selección de la condición ambiental en la que la vacuna es más estable. Usos para este procedimiento incluyen optimizar las condiciones de almacenamiento de una vacuna. La condición ambiental puede ser una condición química (por ejemplo, exposición a un componente químico, por ejemplo, un disolvente, vehículo, etc.), pH, temperatura, humedad, etc. o una combinación de los mismos.

General

La expresión "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en" por ejemplo, una composición "que comprende" X puede constar exclusivamente de X o puede incluir algo adicional por ejemplo, X + Y.

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

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

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las estructuras de, y diferencias entre, los sacáridos capsulares de serotipos GBS Ia y III.

La Figura 2 muestra las estructuras de los sacáridos capsulares de los serotipos GBS Ia, Ib, II, III y V.

La Figura 3 (diagramas A y B) muestra los resultados de un ensayo colorimétrico con y sin K_2HPO_4 y muestra que K_2HPO_4 no interfiere con el análisis de sacárido por el ensayo colorimétrico.

La Figura 3 (diagramas C y D) muestra los resultados de un microensayo con BCA con y sin K_2HPO_4 y muestra que K_2HPO_4 no interfiere con el análisis de vehículo por microensayo con BCA.

Modos de realizar la invención

Cuantificación de un bajo nivel de sacárido no conjugado en vacuna conjugada TT, CRM₁₉₇, GBS67 o GBS80 después de separación por precipitación selectiva

La invención se ejemplifica por el análisis del contenido de sacárido no conjugado de vacunas conjugadas GBS de TT (toxide tetánico), CRM₁₉₇ (derivado de toxina diftérica), GBS67 o GBS80. Las vacunas conjugadas se tamponaron en solución de fosfato sódico 10 mM a pH 7,2.

1. Separación de conjugados por precipitación con sal

Para precipitar los conjugados, se añadieron 500 μ l de solución saturada de K_2HPO_4 (150 g por 100 ml de H₂O fría (-8,6 M; pH 10,30)) a 500 μ l de conjugado a granel (contenido de sacárido ~1 mg/ml; contenido de proteína ~0,8 mg/ml) produciendo una muestra que tenía un pH de 9,66. La mezcla se incubó en un baño de hielo a 0°C durante 10 minutos.

La mezcla se centrifugó en una Microfuga 11 de Beckman a 13000 rpm durante 20 minutos y el sedimento se adsorbió a la pared del vial. El sobrenadante se retiró y después se analizó para estimar el contenido de sacárido.

2. Determinación de contenido de ácido siálico por ensayo colorimétrico

El contenido de ácido siálico en el conjugado a granel (polisacárido total como polisacárido libre y unido) y en el sobrenadante de precipitación (polisacárido libre) se estimó por el procedimiento de Svennerholm [94] (modificado por calentamiento a 110°C durante 20 minutos en lugar de 40 minutos).

El porcentaje de contenido de polisacárido no conjugado (PS) se calculó por la proporción:

$$5 \quad \% \text{ de PS no conjugado} = [\text{PS libre} / \text{PS total}] * 100$$

3. Resultados

El porcentaje de sacárido no conjugado (libre) de las diversas vacunas conjugadas se determinó del siguiente modo (tabla 1):

Tabla 1

Tipo GBS	Vehículo	% de sacárido libre
Ia	CRM	<1,0%
	GBS80	3,5%
	GBS67	<1%
Ib	CRM	1,8%
	GBS80	14,8%
	GBS67	< 1,0%
III	CRM	1,6%
	CRM	4,4%
	TetTox	3,8%
	GBS80	9,1%
	GBS67	<1,0%

10 La invención por tanto proporciona un procedimiento de precipitación simple y rápido para separar bajos niveles de sacárido libre de conjugados en un producto a granel. Se descubrió que el sacárido no conjugado permanece en el sobrenadante sin precipitación, aunque el sacárido conjugado precipite.

El reactivo básico no interfiere con el análisis de sacárido

Para asegurar que el K₂HPO₄ no interfiere con el ensayo colorimétrico, se ensayaron soluciones convencionales de ácido siálico, con y sin adición de solución de K₂HPO₄.

15 Como puede observarse a partir de la figura 3, los resultados del ensayo colorimétrico con adición de K₂HPO₄ (diagrama A) son casi idénticos a los resultados sin K₂HPO₄ (diagrama B). Los valores absolutos del ensayo colorimétrico se muestran en el eje y como una función de la concentración de ácido siálico. Puede observarse que la precipitación con K₂HPO₄ en los procedimientos de la invención no interfiere con el ensayo colorimétrico.

El reactivo básico no interfiere con el análisis de vehículo

20 Para asegurar que el K₂HPO₄ no interfiere con el análisis de vehículo, se ensayaron soluciones convencionales de albumina sérica bovina (BSA) como vehículo de ensayo, con y sin adición de solución de K₂HPO₄, por un microensayo con BCA.

25 Como puede observarse a partir de la figura 3, los resultados del microensayo con BCA con adición de K₂HPO₄ (diagrama C) son muy similares a los resultados sin K₂HPO₄ (diagrama D). Los valores absolutos del ensayo con BCA se muestran en el eje y como una función de la concentración de BSA. Puede observarse que la precipitación con K₂HPO₄ en los procedimientos de la invención no interfiere con el ensayo con BCA.

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y pueden hacerse modificaciones mientras sigan dentro del alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

- 30 [1] Vaccines (eds. Plotkin y col.) 4ª edición, ISBN: 0721696880.
 [2] Baker y col. (2003) J Infect Dis 188:66-73.
 [3] Theilacker y col. (2003) Infect Immun 71:3875-84.
 [4] Anónimo (2003) Drugs R D 4:383-5.
 [5] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49.
 35 [6] Documento WO02/058737
 [7] Documento WO03/007985.
 [8] Rennels y col. (2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979.
 [9] Campbell y col. (2002) J Infect Dis 186:1848-1851.
 [10] Costantino y col. (1992) Vaccine 10:691-698.
 40 [11] Lieberman y col. (1996) JAMA 275:1499-1503.

- [12] Darkes y Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- [13] Ugozzoli (2002) *J Infect Dis* 186:1358-61.
- [14] Granoff y col. (1997) *Infect Immun* 65:1710-5.
- 5 [15] Paradiso y Lindberg (1996) *Dev Biol Stand* 87:269-275.
- [16] Corbel (1996) *Dev Biol Stand* 87:113-124.
- [17] Documento WO03/080678.
- [18] Klug (1996) *Dev Biol Stand* 87:263-267.
- [19] Plumb y Yost (1996) *Vaccine* 14:399-404.
- 10 [20] Lei y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-64.
- [21] Jumel y col. (2002) *Biotechnol Appl Biochem* 36:219-226.
- [22] Bardotti y col. (2000) *Vaccine* 18:1982-1993
- [23] Deng y col. (2000) *J. Biol Chem* 275(11):7497-7504
- [24] Paoletti y col. (1990) *J Biol Chem* 265:18278-83
- 15 [25] Paoletti y col. (1992) *J Clin Invest* 89:203-9
- [26] Wessels y col. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9170-4
- [27] Wang y col. (2003) *Vaccine* 21: 1112-7
- [28] Patentes de Estados Unidos 6027733 y 6274144
- [29] Documento WO2005/090986.
- 20 [30] Hardy y col. (1988) *Anal Biochem* 170:54-62.
- [31] Wang y col. (1990) *Anal Biochem* 190:182-187.
- [32] Ashwell (1957) *Methods Enzymology* 3:73-105
- [33] Stoscheck (1990) *Methods Enzymology* 182:50-68
- [34] Documento WO02/09643.
- 25 [35] Katial y col. (2002) *Infect Immun* 70:702-707.
- [36] Documento WO01/52885.
- [37] Patente europea 0301992.
- [38] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- [39] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [40] Documento WO02/09746.
- 30 [41] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [42] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [43] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [44] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [45] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- 35 [46] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [47] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Supl.: S63-68 y 79-80.
- [48] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [49] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [50] Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- 40 [51] Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [52] Zimmanman y Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [53] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [54] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl. 2:S28-36.
- [55] Buttery y Moxon (2000) *JR Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- 45 [56] Ahmad y Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- [57] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [58] Patente europea 0477508.
- [59] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
- [60] Documento WO98/42721.
- 50 [61] *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.
- [62] Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 ó 012342335X.
- [63] Patente de Estados Unidos 4.761.283
- [64] Patente de Estados Unidos 4.356.170
- [65] Documento WO00/10599
- 55 [66] Gever y col. *Med. Microbiol. Immunol.* 165: 171-288 (1979).
- [67] Patente de Estados Unidos 4.057.685.
- [68] Patentes de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [69] Patente de Estados Unidos 4.459.286.
- [70] Patente de Estados Unidos 4.965.338.
- 60 [71] Patente de Estados Unidos 4.663.160.
- [72] Anónimo (Enero 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [73] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [74] Anderson y col. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [75] Documento EP-A-0372501.
- 65 [76] Documento EP-A-0378881.
- [77] Documento EP-A-0427347.

- [78] Documento WO93/17712
[79] Documento WO94/03208.
[80] Documento WO98/58668.
5 [81] Documento EP-A-0471177.
[82] Documento WO91/01146
[83] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
[84] Baraldo y col. (2004) Infect Immun.72:4884-7
[85] Documento EP-A-0594610.
10 [86] Documento WO00/56360.
[87] Documento WO02/091998.
[88] Documento WO01/72337
[89] Documento WO00/61761.
[90] Documento WO99/42130
15 [91] Glode y col. (1979) J Infect Dis 139:52-56
[92] Documento WO94/05325; patente de Estados Unidos 5.425.946.
[93] Documento WO2005/033148
[94] Svennerholm (1957) Biochem Biophys Acta 24:604-11

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para analizar el grado de no conjugación de una muestra que comprende un componente de sacárido conjugado y un componente no conjugado, que comprende las etapas de (i) poner en contacto la muestra con un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar selectivamente el componente de sacárido conjugado de la muestra y obtener de este modo un sobrenadante que comprende el componente no conjugado separado y (ii) analizar el contenido del sobrenadante para dar el contenido no conjugado de la muestra, en el que el componente de sacárido conjugado es un conjugado sacárido-vehículo unido covalentemente, el sacárido conjugado se precipita selectivamente del sacárido no conjugado con el reactivo básico en condiciones básicas, y las condiciones básicas son de pH 9 a 11.
2. Un procedimiento para preparar una muestra que comprende un componente de sacárido conjugado y un componente no conjugado para el análisis de su grado de no conjugación, que comprende la etapa de poner en contacto la muestra con un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar selectivamente el componente de sacárido conjugado de la muestra y obtener de este modo un sobrenadante que comprende el componente no conjugado separado, en el que el componente de sacárido conjugado es un conjugado sacárido-vehículo unido covalentemente, el sacárido conjugado se precipita selectivamente del sacárido no conjugado con el reactivo básico en condiciones básicas, y las condiciones básicas son de pH 9 a 11.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el componente no conjugado es un componente de sacárido no conjugado y/o el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de medir el contenido total de sacárido de la muestra.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el componente no conjugado es un componente de vehículo no conjugado y/o el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de medir el contenido total de vehículo de la muestra.
5. Un procedimiento para separar un componente de sacárido conjugado en una muestra de un componente no conjugado en la muestra, que comprende la etapa de poner en contacto la muestra con un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar selectivamente el componente de sacárido conjugado de la muestra, en el que el componente de sacárido conjugado es un conjugado sacárido-vehículo unido covalentemente, el sacárido conjugado se precipita selectivamente del sacárido no conjugado con el reactivo básico en condiciones básicas, y las condiciones básicas son de pH 9 a 11.
6. El uso de un reactivo básico en condiciones básicas para precipitar selectivamente un componente de sacárido conjugado en una muestra de un componente no conjugado en la muestra, separando de este modo el componente de sacárido conjugado del componente no conjugado, en el que el componente de sacárido conjugado es un conjugado sacárido-vehículo unido covalentemente, el sacárido conjugado se precipita selectivamente del sacárido no conjugado con el reactivo básico en condiciones básicas, y las condiciones básicas son de pH 9 a 11.
7. EL procedimiento de la reivindicación 5 o uso de la reivindicación 6, en el que el componente no conjugado es un componente de sacárido no conjugado o un componente de vehículo no conjugado.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 7 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que el reactivo básico comprende una sal liotrópica que es K_2HPO_4 .
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 7 a 8 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que las condiciones básicas son de pH 9,5 a 9,9 y opcionalmente el reactivo básico comprende K_2HPO_4 .
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 7 a 9 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el sacárido conjugado es un antígeno sacárido conjugado con una proteína vehículo.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 7 a 10 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que la muestra es una vacuna, particularmente una vacuna de glucoconjugado, más particularmente una vacuna de glucoconjugado que comprende un conjugado que comprende un sacárido que contiene un resto de ácido siálico o una vacuna de glucoconjugado que comprende un conjugado que comprende un sacárido capsular bacteriano de *Streptococcus agalactiae*, por ejemplo, de *Streptococcus agalactiae* serogrupo Ia, Ib, II, III o V.
12. Un procedimiento de liberización de una vacuna para su uso por médicos, que comprende las etapas de: (a) fabricar una vacuna que comprende un sacárido conjugado; (b) analizar el grado de no conjugación de la vacuna por un procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2; y, si los resultados de la etapa (b) indican un grado de no conjugación aceptable para uso clínico, (c) liberar la vacuna para su uso por médicos.
13. Un procedimiento para preparar una composición de vacuna, que comprende una etapa de analizar el grado de no conjugación de la vacuna por un procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2, incluyendo una etapa de medición del pH, seguida por una etapa de ajuste del pH de la composición a un valor deseado, por ejemplo, entre 6

y 8, o aproximadamente 7.

- 5 14. Un procedimiento para envasar una vacuna, que comprende las etapas de: (a) fabricar una vacuna a granel que contiene un sacárido conjugado; (b) analizar el grado de no conjugación de la vacuna a granel por un procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2; (c) opcionalmente, analizar la vacuna a granel para el pH y/u otras propiedades; y, si los resultados de la etapa (b) y (c) indican que la vacuna a granel es aceptable para uso clínico, (d) preparar y envasar la vacuna para uso humano a partir del granel.

Figura 1

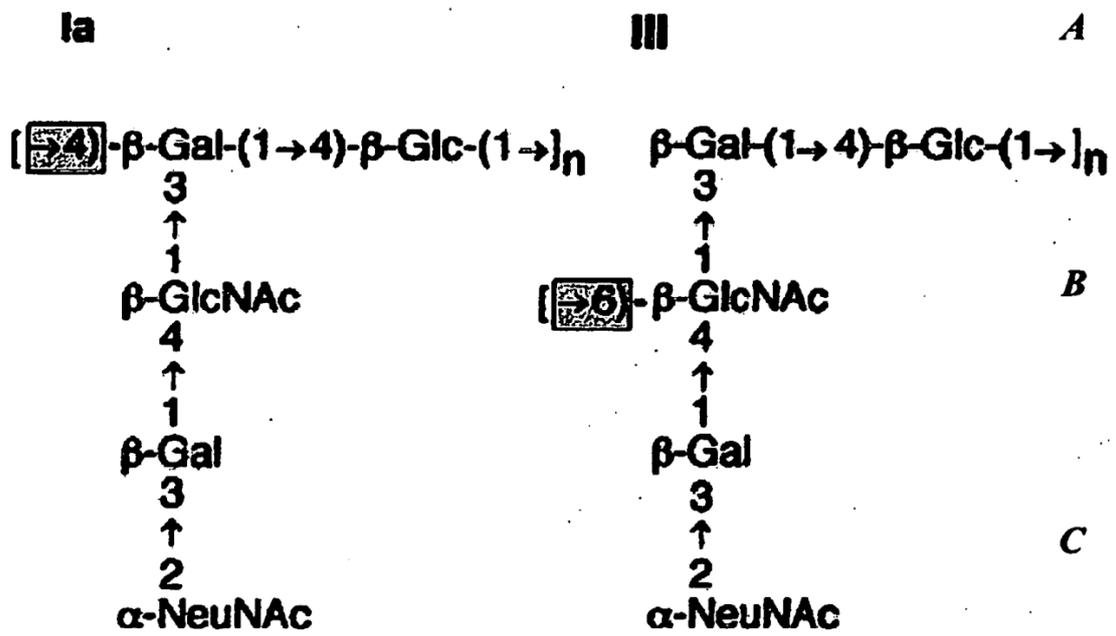


Figura 2

<p>Ia</p>	$ \begin{array}{c} \text{[}\rightarrow\text{4)}\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{)}_n \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \\ \uparrow \\ 4 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Galp} \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 2 \\ \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $
<p>Ib</p>	$ \begin{array}{c} \text{[}\rightarrow\text{4)}\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{)}_n \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Galp} \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 2 \\ \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $
<p>II</p>	$ \begin{array}{c} \text{[}\rightarrow\text{4)}\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)}\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)}\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{2)}\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{)}_n \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 6 \qquad \qquad \qquad 3 \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 1 \qquad \qquad \qquad 2 \\ \beta\text{-D-Galp} \qquad \qquad \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $
<p>III</p>	$ \begin{array}{c} \text{[}\rightarrow\text{4)}\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)}\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)}\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{)} \\ \uparrow \\ 4 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Galp} \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 2 \\ \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $
<p>V</p>	$ \begin{array}{c} \text{[}\rightarrow\text{4)}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)} \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 6 \qquad \qquad \qquad 3 \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 1 \qquad \qquad \qquad 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \quad \beta\text{-D-Glcp} \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 4 \qquad \qquad \qquad 1 \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 1 \qquad \qquad \qquad 1 \\ \beta\text{-D-Galp} \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 2 \\ \alpha\text{-D-NeupNAc} \end{array} $

Figura 3

