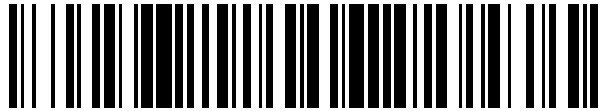


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 465**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2005 E 05770612 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 1778291**

54 Título: **Análisis dimensional de conjugados de sacáridos con GPC y SEC-MALS**

30 Prioridad:

21.06.2004 GB 0413868

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

19.02.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CAPANNOLI, GIORGIO;
CARINCI, VALERIA;
D'ASCENZI, SANDRO y
MAGAGNOLI, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 443 465 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).

Análisis dimensional de conjugados de sacáridos con GPC y SEC-MALS**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO TÉCNICO**

La presente invención está en el campo del análisis y el control de calidad de vacunas que incluyen sacáridos capsulares bacterianos que están conjugados con un transportador.

10 TÉCNICA ANTERIOR

Los inmunógenos que comprenden antígenos de sacáridos capsulares conjugados con proteínas transportadoras son muy conocidos en la técnica. La conjugación convierte antígenos independientes de T en antígenos dependientes de T, potenciando así respuestas de memoria y permitiendo inmunidad protectora para el desarrollo, y la vacuna de conjugado prototipo era para *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) [por ejemplo, véase el Capítulo 14 de la ref. 1]. Desde la vacuna de Hib se han desarrollado vacunas de sacáridos conjugados para proteger contra *Neisseria meningitidis* (meningococo) y contra *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Otros organismos en los que las vacunas de conjugado son de interés son *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [2], *Pseudomonas aeruginosa* [3] y *Staphylococcus aureus* [4].

En vez de usar sacáridos capsulares de longitud completa es posible seleccionar fragmentos de oligosacáridos de tamaño deseado después de una etapa de hidrólisis [por ejemplo, la ref. 5], y se ha informado que conjugados preparados con oligosacáridos de longitud de cadena media ofrecen inmunogenicidad mejorada [por ejemplo, las refs. 6 y 7]. De las tres vacunas conjugadas del serogrupo C de *N. meningitidis* que se han aprobado para uso humano, Menjugate™ [8] y Meningitec™ se basan en oligosacáridos, mientras que NeisVac-C™ usa polisacárido de longitud completa.

Cuando los conjugados se incluyen en una vacuna, el control de calidad de la fabricación y liberación generalmente requiere que tengan un tamaño molecular y/o masa molar definidos, y también que estos parámetros sean coherentes entre lotes. El tamaño molecular y la masa molar también pueden usarse para monitorizar la estabilidad de vacunas, ya que los conjugados pueden agregarse con el tiempo, provocando un aumento en el tamaño y la masa.

Es un objetivo de la invención proporcionar procedimientos nuevos y mejorados para medir el tamaño molecular, masa molar y parámetros relacionados para antígenos de sacáridos conjugados, en particular para conjugados de sacáridos meningocócicos.

El documento WO 02/058737 desvela un vacuna de conjugado meningocócica multivalente que comprende polisacáridos de los serogrupos A, C, W-135 e Y. En algunos casos, el documento WO 02/058737 menciona medir el tamaño de los conjugados, pero no se facilitan datos.

D'Ambra y col. (Developments in Biologicals, 2000, 103, 2000, páginas 241 - 242) trata de intentos de usar fotometría de dispersión de la luz de múltiples ángulos y refractometría diferencial (SEC-MALS/RI) con productos intermedios de polisacáridos meningocócicos y neumocócicos.

Jumel y col. (Biotechnology and Applied Biochemistry, 2002, 36, 3, páginas 219 - 226) describen el trabajo experimental usando SEC-MALS/RI que implica conjugados de MenC con una amplia variedad de diferentes tamaños.

Lemercinier y col. (Pharmaceutical Sciences 1997, 3, 1, páginas 19 - 23) se refiere a RMN y cromatografía de líquidos rápida de proteínas (FPLC) para su uso en ensayos que implican *Haemophilus influenzae* tipo b y conjugados de MenC.

Ho y col. (Vaccine, 2000, 19, 7 - 8, páginas 716 - 725) se refiere a conjugados de C-CRM197 meningocócicos que estuvieron aparentemente comercialmente disponibles. No se desvelan valores absolutos para el tamaño o masa de los conjugados.

Von Hunolstein y col. (Vaccine, 1999, 17, 2, 118 - 125) desvelan análisis de vacunas de conjugado de *Haemophilus influenzae* tipo b.

El documento WO 2004/032958 se refiere a vacunas para la protección contra linajes meningocócicos hipervirulentos. Desvela diversos conjugados de proteína – polisacárido, pero no desvela su masa molecular o tamaño molar.

El documento WO 2005/103230, que puede encontrarse bajo el Artículo 54(3) CPE dependiendo de la validez de las reivindicaciones de prioridad implicadas, se refiere a peptona de soja como fuente de nitrógeno en la preparación de

conjugados meningocócicos. Desvela diversos conjugados de proteína – polisacárido, pero no enseña su masa molecular o molar tamaño.

5 El documento WO 2005/032583, que puede encontrarse bajo el Artículo 54(3) CPE dependiendo de la validez de las reivindicaciones de prioridad implicadas, desvela diversos conjugados de proteína – polisacárido, pero no desvela su masa molecular o molar tamaño.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

10 Los inventores han descubierto que la cromatografía de exclusión molecular y SEC-MALS (cromatografía de exclusión por tamaño con detección por fotometría de dispersión de la luz de múltiples ángulos) puede usarse para medir con exactitud y de forma fidedigna el tamaño molecular y la masa molar, respectivamente, de conjugados de sacáridos.

15 Así, la solicitud proporciona un procedimiento para medir el tamaño molecular de un antígeno de sacárido conjugado dentro de una muestra, que comprende una etapa de analizar la muestra por cromatografía de exclusión molecular. El tiempo de retención del análisis de cromatografía puede convertirse en un radio de viscosidad ($R\eta$), por ejemplo, por comparación con una curva de calibración, permitiendo así el simple cálculo del tamaño molecular. El tamaño molecular promedio y/o la distribución de tamaños moleculares de conjugados en la muestra pueden determinarse fácilmente de esta forma.

20 La solicitud también proporciona un procedimiento para medir la masa molar de un antígeno de sacárido conjugado dentro de una muestra, que comprende una etapa de analizar la muestra por SEC-MALS. El tiempo de retención de SEC puede convertirse en masa molar. La masa molar promedio y/o distribución de masa molar (polidispersidad) de conjugados en la muestra puede determinarse fácilmente de esta forma. La referencia 9 informa de que SEC-MALS se ha usado previamente para medir sacáridos neumocócicos y meningocócicos de pre-conjugación, pero no se informan datos de post-conjugación. La invención es las composiciones y lotes descritos en las reivindicaciones.

El sacárido

30 El procedimiento permite la medición de parámetros para antígenos de sacáridos conjugados. El antígeno de sacárido es normalmente un sacárido capsular bacteriano, 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 o VIII), *Haemophilus influenzae* (cepas tipables: a, b, c, d, e o f), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, etc. Otros analitos de sacárido incluyen glucanos (por ejemplo, glucanos fúngicos tales como aquellos en *Candida albicans*), y sacáridos capsulares fúngicos, por ejemplo, de la cápsula de *Cryptococcus neoformans*. El procedimiento es particularmente útil para analizar sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.

40 La cápsula del serogrupo A de *N. meningitidis* es un homopolímero de *N*-acetil-D-manosamina-1-fosfato ligado en ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La cápsula del serogrupo B de *N. meningitidis* es un homopolímero de ácidos siálicos ligados en ($\alpha 2 \rightarrow 8$). El sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* es un homopolímero de ácido siálico ligado en ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido *N*-acetilneuramínico, o 'NeuNAc'), con O-acetilación variable en las posiciones 7 y/u 8. El sacárido del serogrupo W135 de *N. meningitidis* es un polímero que consiste en unidades de disacáridos de ácido siálico-galactosa [$\rightarrow 4$]-D-Neup5Ac(7/90Ac)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow), con O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [10]. El sacárido del serogrupo Y de *N. meningitidis* es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que la unidad de repetición de disacáridos incluye glucosa en lugar de galactosa [$\rightarrow 4$]-D-Neup5Ac(7/90Ac)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Glc- α -(1 \rightarrow). El sacárido capsular de tipo b de *H. influenzae* es un polímero de ribosa, ribitol y fosfato ['PRP', (poli-3- β -D-ribose-(1,1)-D-ribitol-5-fosfato)].

50 Otros antígenos de sacáridos preferidos son sacáridos eucariotas, por ejemplo, sacáridos fúngicos, sacáridos de planta, sacáridos humanos (por ejemplo, antígenos del cáncer), etc. Otros sacáridos preferidos son lipopolisacáridos y lipooligosacáridos.

55 El antígeno de sacárido puede estar en una forma como se encuentra en la naturaleza, o puede estar en una forma derivada, por ejemplo, de un sacárido que se ha sometido a alteración y/o despolimerización química. La invención es particularmente útil para analizar fragmentos de oligosacáridos de polisacáridos capsulares. Los polisacáridos naturales generalmente tienen un grado de polimerización de al menos 20 (por ejemplo 20, 30, 40, 50, 60 o más), y éstos pueden convertirse en fragmentos de oligosacárido (por ejemplo, con un grado de polimerización inferior a 20) por despolimerización, por ejemplo, mediante hidrólisis.

65 La hidrólisis química de sacáridos generalmente implica tratamiento con tanto ácido como base en condiciones que son convencionales en la materia. Las condiciones para la despolimerización de sacáridos capsulares a sus monosacáridos constituyentes se conocen en la técnica. Para los sacáridos del serogrupo W135 e Y se prefiere la hidrólisis ácida. La hidrólisis ácida usando TFA (ácido trifluoroacético) puede usarse para la hidrólisis de todos los

serogrupos C, W135 e Y, prefiriéndose una temperatura de incubación ligeramente menor para el serogrupo C para evitar la degradación de sus ácidos siálicos (90 °C en vez de 100 °C). Un tratamiento con TFA típico implica la adición de TFA a una concentración final de 2 M, seguido de calentamiento a 90-100 °C durante 90 minutos. El sacárido del serogrupo C puede hidrolizarse para análisis del contenido de sacáridos total mediante tratamiento con HCl 100 mM a 80 °C durante 2 horas [11]. Otras condiciones de hidrólisis típicas implican concentraciones milimolares de un ácido débil (por ejemplo, ácido acético) a temperaturas elevadas (por ejemplo, 70-80 °C).

El procedimiento es particularmente útil para su uso con muestras de conjugado que incluyen diversos sacáridos de diferentes longitudes, por ejemplo, diferentes fragmentos del mismo sacárido parental.

Conjugados

El antígeno de sacárido que va a analizarse está conjugado con un transportador. La conjugación covalente se usa para potenciar la inmunogenicidad de sacáridos, convirtiéndolos de antígenos independientes de T en antígenos dependientes de T, permitiendo así sensibilizar a memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica muy conocida [por ejemplo, revisada en las refs. 12 a 21]. Los sacáridos pueden ligarse a transportadores directamente [22, 23], pero generalmente se usa un ligador o espaciador, por ejemplo, ácido adípico, β -propionamido [24], nitrofenil-etilamina [25], haluros de haloacilo [26], enlaces glucosídicos [27], ácido 6-aminocaproico [28], ADH [29], restos C₄ a C₁₂ [30], etc.

Proteínas transportadoras típicas en conjugados son toxinas o toxoides bacterianos tales como toxoide de la difteria o toxoide del tétanos. El derivado de toxina de la difteria CRM197 [31-33] es la proteína transportadora en Menjugate™ y Meningitec™, mientras que el toxoide del tétanos se usa en NeisVac™. El toxoide de la difteria se usa como el transportador en Menactra™. CRM197 es la proteína transportadora en Pevnar™. Otras proteínas transportadoras conocidas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [34], péptidos sintéticos [35, 36], proteínas de choque térmico [37, 38], proteínas de pertussis [39, 40], citocinas [41], linfocinas [41], hormonas [41], factores de crecimiento [41], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopes de linfocitos T CD4⁺ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos [42], proteína D de *H. influenzae* [43,44], proteína de la superficie neumocócica PspA [45], proteínas de captación de hierro [46], toxina A o B de *C. difficile* [47], etc. Las composiciones pueden usar más de una proteína transportadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de la supresión de transportador, y una única proteína transportadora podría llevar más de un antígeno de sacárido [48]. Los conjugados tienen generalmente una relación de sacárido:proteína (peso/peso) de entre 1:5 (es decir, proteína en exceso) y 5:1 (es decir, sacárido en exceso). Las composiciones pueden incluir proteína transportadora libre, además de los conjugados [49].

El procedimiento es particularmente adecuado para analizar conjugados de sacáridos meningocócicos (serogrupos A, C, W135 e Y) para el transportador CRM197. Tales conjugados pueden prepararse mediante los procedimientos desvelados en las referencias 50-53. Conjugados preferidos son aquellos preparados según la referencia 51, es decir, fragmentos de oligosacáridos con un transportador CRM197 y un ligador de ácido adípico.

Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular (GPC) es una técnica muy conocida y convencional. La invención usará generalmente HPGPC (GPC de alto rendimiento). Las técnicas de GPC se usan según la invención para determinar el tamaño hidrodinámico (en una mezcla, el tamaño promedio y/o la distribución de tamaños) de un conjugado en una muestra.

El tiempo de retención en una columna de GPC puede convertirse en un radio de viscosidad ($R\eta$) por técnicas convencionales. Normalmente, el tiempo de retención en una columna se determinará para patrones de tamaño molecular conocido, permitiendo así la correlación de estos dos parámetros. El tamaño molecular de un conjugado puede entonces deducirse a partir de su tiempo de retención en la columna. Por ejemplo, la calibración de una columna usando dextranos de tamaño molecular conocido y sus tiempos de retención pueden correlacionarse con el radio de viscosidad usando una ecuación polinómica de tercer orden [54, 55]. El radio de viscosidad usa viscosidad intrínseca y masa molecular para explicar el efecto que tiene la forma de la molécula en la retención.

En una mezcla heterogénea, la técnica de GPC puede usarse para determinar o bien el tamaño molecular promedio o bien la distribución de tamaño molecular en la mezcla.

SEC-MALS

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una técnica muy conocida. Los resultados de la separación pueden analizarse por fotometría de dispersión de la luz de múltiples ángulos (MALS) y refractometría diferencia. Este procedimiento puede proporcionar información sobre la distribución de masa molar y radio hidrodinámico (tamaño molecular), confirmación y otros parámetros físicos de un polímero, independientes de parámetros cromatográficos tales como velocidad de flujo y fase estacionaria, y sin la necesidad de calibración para la masa molar [9]. En vez de requerir calibración para la masa molar, la determinación de la masa molecular por MALS se

basa en la determinación previa del índice de refracción específico (dn/dc) para el polímero de interés en el disolvente de interés a la longitud de onda y temperatura de interés.

5 Así, SEC-MALS puede usarse para determinar la masa molar de un conjugado. La masa molar de una muestra se determina en cada rebanada de datos de un pico de SEC, como se observa de una representación de Debye típica, determinándose la masa molar a partir de la intersección de la representación [56-58]. La señal del índice de refracción proporcional a la concentración y la señal de MALS a 90° proporcional a la concentración y masa molar pueden superponerse para determinar distribuciones de masa molar.

10 En una mezcla heterogénea, la técnica de SEC-MALS puede usarse para determinar tanto la masa molar promedio como la distribución de masa molar (polidispersidad) en la mezcla.

Composiciones de conjugado

15 La invención proporciona una composición que comprende un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*, en la que el tamaño molecular del conjugado es 57,1 Å y/o la masa molar del conjugado es 88,5 kDa. La composición también puede incluir un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*, en la que la masa molar del conjugado es 190 kDa.

20 La composición también comprende un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, en la que el tamaño molecular del conjugado es 57,0 Å y la masa molar del conjugado es 85,2 kDa.

25 La composición también comprende un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis*, en la que el tamaño molecular del conjugado es 68,7 Å y la masa molar del conjugado es 110,1 kDa. La composición también puede incluir un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis*, en la que la masa molar del conjugado es 347 kDa.

30 La composición también comprende un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis*, en la que el tamaño molecular del conjugado es 63,3 Å y la masa molar del conjugado es 84,7 kDa. La composición también puede incluir un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis*, en la que la masa molar del conjugado es 486 kDa.

35 Aunque los valores anteriores para el tamaño molecular y la masa molar se facilitan como cifras individuales, la invención se extiende a conjugados en los que estas cifras son $\pm 2\%$.

La invención proporciona una composición que comprende 4 de los conjugados de los serogrupos A, C, W135 e Y como se ha descrito anteriormente, en la que el transportador de proteína para cada conjugado es CRM197.

40 La solicitud también proporciona un procedimiento para preparar una vacuna de conjugado multivalente, que comprende las etapas de (a) analizar dos o más conjugados usando un procedimiento de la invención, y (b) combinar los conjugados analizados para formar la vacuna multivalente.

45 La solicitud también proporciona un procedimiento para preparar una vacuna de conjugado multivalente, que comprende las etapas de mezclar dos o más conjugados que se han analizado usando un procedimiento de la invención.

Sacáridos mixtos

50 El procedimiento permite el análisis en composiciones que comprenden conjugados de sacáridos capsulares. En general, el procedimiento se usará para muestras que contienen un único tipo de conjugado (es decir, sacáridos derivados del mismo sacárido capsular, ligado al mismo vehículo). Por tanto, para vacunas de conjugado multivalente (por ejemplo, Menactra™, Prevnar™), el procedimiento se usará generalmente en conjugados individuales antes de que se combinen para preparar el producto multivalente final, en vez de en el propio producto final. Sin embargo, si dos conjugados tienen tamaños moleculares y masas molares muy diferentes, entonces es directo el análisis en paralelo.

Estabilidad durante el almacenamiento

60 El procedimiento puede usarse para monitorizar la estabilidad de conjugados durante el almacenamiento. Así, los métodos del procedimiento pueden realizarse en muestras del mismo material en el tiempo t_1 y t_2 y los resultados del análisis pueden compararse. Un cambio significativo en la masa molar y/o tamaño molecular indica que la vacuna no es completamente estable. Así, el procedimiento puede usarse para seleccionar vacunas estables y rechazar vacunas inestables.

65 **Componentes no de conjugado**

Además de analizar los conjugados en una composición, los procedimientos pueden incluir análisis de otros componentes o propiedades, por ejemplo, osmolalidad, pH, grado de polimerización para sacáridos o conjugados individuales, contenido de proteína (particularmente para proteínas transportadoras), contenido de aluminio, contenido de detergente, contenido de conservante, etc.

5 La solicitud proporciona un procedimiento para preparar una composición de vacuna, que comprende una etapa de análisis de la masa molar y/o tamaño molecular de un conjugado según la invención y una etapa de medición del pH de la composición, opcionalmente seguida de una etapa de ajuste del pH de la composición a un valor deseado, por ejemplo, entre 6 y 8, o aproximadamente 7.

10 La solicitud también proporciona un procedimiento para preparar una composición de vacuna, que comprende las etapas de: (a) proporcionar uno o más conjugados que son como se han descrito anteriormente; (b) formular el (los) conjugado(s) en una vacuna a granel; (c) analizar la vacuna a granel para pH y/u otras propiedades; y, si los resultados de la etapa (c) indican que la vacuna a granel es aceptable para uso clínico, (d) preparar y envasar la vacuna para uso médico del granel. La etapa (c) puede implicar evaluación de la concentración mínima de sacárido, evaluación de la relación de sacárido sin conjugado:conjugado, etc. La etapa (d) puede implicar envasar en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiples, por ejemplo, en viales o en jeringuillas. Una dosis humana típica para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

20 La solicitud también proporciona un procedimiento para preparar una composición de vacuna, que comprende las etapas de: (a) proporcionar uno o más conjugados que son como se han descrito anteriormente; y (b) mezclar el sacárido conjugado con uno o más antígenos adicionales, por ejemplo, con

- un antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*.
- 25 - un antígeno de sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*.
- un antígeno de proteína del serogrupo B de *N. meningitidis*.
- preparaciones de microvesículas del serogrupo B de *N. meningitidis* [59], 'OMV nativas' [60], bullas o vesículas de la membrana externa [por ejemplo, refs. 61 a 66, etc.].
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b.
- 30 - un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, tal como antígenos de sacáridos conjugados polivalentes [por ejemplo, refs. 67 a 69].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, 70, 71].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como antígenos de la superficie y/o del núcleo [por ejemplo, 71, 72].
- 35 - un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, refs. 73 y 74]. Pueden usarse antígenos de pertussis celular.
- un antígeno de la difteria, tal como un toxoide de la difteria [por ejemplo, Capítulo 3 de la ref. 75], por ejemplo, el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo, 76].
- 40 - un antígeno del tétanos, tal como un toxoide del tétanos [por ejemplo, Capítulo 4 de la ref. 75].
- antígeno(s) de la poliomiелitis [por ejemplo, 77, 78], tales como IPV.

Tales antígenos pueden adsorberse a un adyuvante de sal de aluminio (por ejemplo, un hidróxido o un fosfato). Cualquier antígeno de sacárido adicional se incluye preferentemente como conjugado.

45 Los conjugados de la invención pueden adsorberse similarmente a un adyuvante de sal de aluminio (por ejemplo, un hidróxido o un fosfato), o pueden no adsorberse (por ejemplo, libres en disolución).

Conformidad lote a lote

50 Los procedimientos de la solicitud son fidedignos y coherentes, y así permiten comparaciones válidas de diferentes lotes de conjugados. Diferentes lotes de conjugados pueden así prepararse, ensayarse y pueden seleccionarse lotes coherentes para lanzamiento y uso en la preparación de vacunas de conjugado, mientras que lotes anómalos pueden desecharse.

55 La invención proporciona dos lotes de una vacuna, en los que: (a) ambos lotes de vacuna comprenden: (i) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo A de *Neisseria meningitidis*; (ii) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo C de *Neisseria meningitidis*; (iii) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo W135 de *Neisseria meningitidis*; (iv) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo Y de *Neisseria meningitidis*, en los que cada conjugado es como se define en la reivindicación 1; (b) el tamaño molecular del sacárido del serogrupo A en el primer lote es A_1 y el tamaño molecular del sacárido del serogrupo A en el segundo lote es A_2 ; (c) el tamaño molecular del sacárido del serogrupo C en el primer lote es C_1 y el tamaño molecular del sacárido del serogrupo C en el segundo lote es C_2 ; (d) el tamaño molecular del sacárido del serogrupo W135 en el primer lote es W_1 y el tamaño molecular del sacárido del serogrupo W135 en el segundo lote es W_2 ; (e) el tamaño molecular del sacárido del serogrupo Y en el primer lote es Y_1 y el tamaño molecular del sacárido del serogrupo Y en el segundo lote es Y_2 ; (f) las relaciones A_1/A_2 , C_1/C_2 , W_1/W_2 y Y_1/Y_2 están cada una entre 0,95 y 1,05.

La invención proporciona dos lotes de una vacuna, en los que: (a) ambos lotes de vacuna comprenden: (i) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo A de *Neisseria meningitidis*; (ii) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo C de *Neisseria meningitidis*; (iii) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo W135 de *Neisseria meningitidis*; (iv) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo Y de *Neisseria meningitidis* en los que cada conjugado es como se define en la reivindicación 1; (b) la masa molar del sacárido del serogrupo A en el primer lote es A_1 y la masa molar del sacárido del serogrupo A en el segundo lote es A_2 ; (c) la masa molar del sacárido del serogrupo C en el primer lote es C_1 y la masa molar del sacárido del serogrupo C en el segundo lote es C_2 ; (d) la masa molar del sacárido del serogrupo W135 en el primer lote es W_1 y la masa molar del sacárido del serogrupo W135 en el segundo lote es W_2 ; (e) la masa molar del sacárido del serogrupo Y en el primer lote es Y_1 y la masa molar del sacárido del serogrupo Y en el segundo lote es Y_2 ; (f) las relaciones A_1/A_2 , C_1/C_2 , W_1/W_2 y Y_1/Y_2 están cada una entre 0,95 y 1,05.

Las relaciones especificadas en (f) pueden basarse en comparar una única muestra de cada lote, pero normalmente se basarán en valores promedios (por ejemplo, medias) de múltiples muestras de cada lote. Así, los dos lotes pueden someterse a muestreo múltiple, y cada muestra puede someterse a múltiples mediciones de A_1 , A_2 , C_1 , C_2 , W_1 , W_2 , Y_1 y Y_2 , siendo entonces los promedios calculados para cada lote, y siendo los promedios usados para calcular las relaciones necesarias.

Cada lote de vacuna se habrá preparado por separado. Por ejemplo, pueden prepararse dos lotes diferentes por mezclas separadas de los mismos conjugados individuales a granel, o mezclando conjugados individuales a granel que se prepararon por separado. Diferentes muestras de la misma mezcla a granel no son lotes diferentes, ya que estas muestras no están sometidas a las variaciones lote a lote que resultan de diferencias que se producen cuando se preparan mezclas de diferentes conjugados.

Parte general

El término "que comprende" engloba "que incluye", además de "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en 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 con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una curva de calibración de seis dextranos de tamaños hidrodinámicos conocidos. Las Figuras 2 a 5 muestran análisis de HPGPC de conjugados de CRM197 de los serogrupos A, C, W135 e Y. La Figura 6 muestra la salida de voltaje ajustada de concentraciones conocidas para calibración de dn/dc en las Figuras 7 y 8. La Figura 9 muestra una representación de Debye de SEC-MALS, y la Figura 10 muestra una superposición de la señal de RI y la señal de MALS a 90° . Las Figuras 11 a 14 muestran análisis de masa molar por SEC-MALS para conjugados de CRM197 de los serogrupos A, C, W135 e Y.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Los conjugados de CRM197 de oligosacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y de meningococo se prepararon como generalmente se ha descrito en la referencia 51. Cada uno de estos conjugados se analizó por HPGPC y SEC-MALS según la invención.

Las vacunas de glucoconjugado generalmente consisten en una matriz de glucoformas con un intervalo de sacáridos de diferentes longitudes, unidos a un transportador de proteína en múltiples sitios. HPGPC se usó para caracterizar los glucoconjugados meningocócicos en términos de tamaño molecular, determinando su tamaño hidrodinámico y distribución de tamaño.

La calibración usó un conjunto de seis dextranos con tamaño hidrodinámico que oscila de 17 a 115 Å. El análisis de HPGPC de los patrones se muestra en la Figura 1. Los pesos moleculares patrón y los pesos moleculares calculados fueron del siguiente modo:

65

Estándar	115360	54130	26000	91840	38560	17590
Calculada	115666	53847	25425	91514	39280	17767

5 El análisis de dextranos se usó para correlacionar el radio de viscosidad (R_{η}) con el tiempo de retención de GPC usando una ecuación polinómica de tercer orden [54, 55]:

$$R_{\eta} \text{ (en \AA)} = (10^8) (30 M_p [\eta] / (\pi \times 6,023 \times 10^{23}))^{1/3}$$

10 en la que: $M_p = M_w$ apical y $[\eta]$ = viscosidad intrínseca en dl/g

Los radios de viscosidad de los conjugados se calcularon a partir de esta ecuación, que usa viscosidad intrínseca y M_w para explicar el efecto que tiene la forma de la molécula en la retención.

15 Los análisis de conjugados individuales se muestran en las Figuras 2 a 5. Los tamaños hidrodinámicos se calcularon del siguiente modo:

Serogrupo	A	C	W135	Y
Tamaño (Å)	57.1	57.0	68.7	63.3
Polidispersidad	1.032	1.018	1.040	1.035

25 Como condiciones de ejemplo para el análisis, el conjugado del serogrupo A se analizó en un volumen de inyección de 50 μ l en un TSK-Gel G4000SW (300 x 7,5 mm de DI), con una fase móvil de fosfato de sodio 0,1 M / sulfato de amonio 0,2 M, pH 7,0. La velocidad de flujo fue 0,5 ml/min. Se usó un detector del índice de refracción Waters 410.

Análisis de SEC-MALS

30 Antes de los análisis de SEC-MALS, los índices de refracción (dn/dc) de los conjugados se determinaron bajo las condiciones de análisis. Un voltaje de salida de ejemplo para fijar la concentración se muestra en la Figura 6. Esta salida conduce a las curvas patrón mostradas en las Figuras 7 y 8. Los valores calculados fueron del siguiente modo:

Serogrupo	A	C	W135	Y
dn/dc	0.163	0.190	0.159	0.201

40 Los conjugados se analizaron por SEC-MALS. La masa molar de las muestras se determinó en cada rebanada de datos de un pico de SEC, como se observa de una representación de Debye típica en la Figura 9. La masa molar se determinó a partir de la intersección de la representación [56-58]. Pueden superponerse la señal de RI (azul), proporcional a la concentración, y el detector de MALS a 90° (rojo), proporcional a la concentración y masa molar (Figura 10).

45 Los análisis de masa molar (gramos por mol) se muestran en las Figuras 11 a 14. Los análisis muestran que los glucoconjugados de MenA, MenW135 y MenY tienen un pico importante con un hombro de baja concentración de mayor MW, mientras que el conjugado de MenC tiene un único pico de material más homogéneo.

50 Los resultados de los análisis para los picos (MW en kDa; polidispersidad en M_w/M_n) fueron del siguiente modo:

		A	C	W135	Y
Pico principal	MW	88.540	85.230	110.100	84.650
	Polidispersidad	1.012	1.011	1.049	1.050
Desnivel	MW	190.000	-	485.800	347.200
	Polidispersidad	1.053	-	1.090	1.096

65 Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solo y pueden hacerse modificaciones, mientras que estén dentro del alcance de la invención.

REFERENCIAS

- 5 [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] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
 [6] Paoletti y col. (1992) *J Clin Invest* 89:203-9.
 10 [7] Anderson y col. (1986) *J Immunol* 137:1181-6.
 [8] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
 [9] D'Ambra y col. (2000) *Dev Biol Basel* 103:241-242.
 [10] Documento WO2005/033148.
 [11] Jumel y col. (2002) *Biotechnol Appl Biochem* 36:219-226.
 15 [12] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
 [13] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
 [14] Buttery & Moxon (2000) *JR Coll Physicians Lond* 34:163-168.
 [15] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
 [16] Goldblatt (1998) *J. Med Microbiol.* 47:563-567.
 20 [17] Patente europea 0477508.
 [18] Patente de EE.UU. 5.306.492.
 [19] Documento WO98/42721.
 [20] Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.
 [21] Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 ó 012342335X.
 25 [22] Patente de EE.UU. 4.761.283
 [23] Patente de EE.UU. 4.356.170.
 [24] Documento WO00/10599
 [25] Gever y col. *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
 [26] Patente de EE.UU. 4.057.685.
 30 [27] Patentes de EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
 [28] Patente de EE.UU. 4.459.286.
 [29] Patente de EE.UU. 4.965.338
 [30] Patente de EE.UU. 4.663.160.
 [31] Anónimo (enero de 2002) *Research Disclosure*, 453077.
 35 [32] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
 [33] Anderson y col. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
 [34] Documento EP-A-0372501.
 [35] Documento EP-A-0378881.
 [36] Documento EP-A-0427347.
 40 [37] Documento WO93/17712
 [38] Documento WO94/03208.
 [39] Documento WO98/58668.
 [40] Documento EP-A-0471177.
 [41] Documento WO91/01146
 45 [42] Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
 [43] Documento EP-A-0594610.
 [44] Documento WO00/56360.
 [45] Documento WO02/091998.
 [46] Documento WO01/72337
 50 [47] Documento WO00/61761.
 [48] Documento WO99/42130
 [49] Documento WO96/40242
 [50] Documento WO02/058737.
 [51] Documento WO03/007985.
 55 [52] Rennels y col. (2002) *Pediatr Infect Dis J* 21:978-979.
 [53] Campbell y col. (2002) *J Infect Dis* 186:1848-1851.
 [54] Kunitani y col. (1991) *J Chrom* 588:125ff.
 [55] Kunitani y col. (1993) *J Chrom* 632:19ff.
 [56] Wyatt (1997) *Instrumentation Science & Technology* 25(1):1ff.
 60 [57] Wen y col. (1996) *Anal Biochem* 240:155ff.
 [58] Rollings (1992) in *Laser Light Scattering in Biochemistry*, Capítulo 19.
 [59] Documento WO02/09643.
 [60] Katial y col. (2002) *Infect Immun* 70:702-707.
 [61] Documento WO01/52885.
 65 [62] Patente europea 0301992.

[63] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
[64] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
[65] Documento WO02/09746.
[66] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
5 [67] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
[68] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
[69] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
[70] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
[71] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
10 [72] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
[73] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
[74] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
[75] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
[76] Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
15 [77] Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
[78] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*, en la que el tamaño molecular del conjugado es $5,71 \pm 2\%$ nm ($57,1 \pm 2\%$ Å) y la masa molar del conjugado es $88,5 \pm 2\%$ kDa, un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, en la que el tamaño molecular del conjugado es $5,70 \pm 2\%$ nm ($57,0 \pm 2\%$ Å) y la masa molar del conjugado es $85,2 \pm 2\%$ kDa, un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo de W135 de *N. meningitidis*, en la que el tamaño molecular del conjugado es $6,87 \pm 2\%$ nm ($68,7 \pm 2\%$ Å) y la masa molar del conjugado es $110,1 \pm 2\%$ kDa, y un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis*, en la que el tamaño molecular del conjugado es $6,33 \pm 2\%$ nm ($63,3 \pm 2\%$ Å) y la masa molar del conjugado es $84,7 \pm 2\%$ kDa,

15 en la que el transportador de proteína para cada conjugado es CRM 197.

2. Dos lotes de una vacuna, en los que: (a) ambos lotes de vacuna comprenden: (i) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo A de *Neisseria meningitidis*; (ii) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo C de *Neisseria meningitidis*; (iii) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo W135 de *Neisseria meningitidis*; (iv) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo Y de *Neisseria meningitidis*, en los que cada conjugado es como se define en la reivindicación 1; (b) el tamaño molecular del sacárido del serogrupo A en el primer lote es A1 y el tamaño molecular del sacárido del serogrupo A en el segundo lote es A2; (c) el tamaño molecular del sacárido del serogrupo C en el primer lote es C1 y el tamaño molecular del sacárido del serogrupo C en el segundo lote es C2; (d) el tamaño molecular del sacárido del serogrupo W135 en el primer lote es W1 y el tamaño molecular del sacárido del serogrupo W135 en el segundo lote es W2; (e) el tamaño molecular del sacárido del serogrupo Y en el primer lote es Y1 y el tamaño molecular del sacárido del serogrupo Y en el segundo lote es Y2; (f) las relaciones A1/A2, C1/C2, W1/W2 y Y1/Y2 están cada una entre 0,95 y 1,05.

3. Dos lotes de una vacuna, en los que: (a) ambos lotes de vacuna comprenden: (i) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo A de *Neisseria meningitidis*; (ii) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo C de *Neisseria meningitidis*; (iii) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo W 135 de *Neisseria meningitidis*; (iv) un conjugado de un sacárido capsular del serogrupo Y de *Neisseria meningitidis*, en los que cada conjugado es como se define en la reivindicación 1; (b) la masa molar del sacárido del serogrupo A en el primer lote es A 1 y la masa molar del sacárido del serogrupo A en el segundo lote es A2; (c) la masa molar del sacárido del serogrupo C en el primer lote es C1 y la masa molar del sacárido del serogrupo C en el segundo lote es C2; (d) la masa molar del sacárido del serogrupo W135 en el primer lote es W1 y la masa molar del sacárido del serogrupo W135 en el segundo lote es W2; (e) la masa molar del sacárido del serogrupo Y en el primer lote es Y1 y la masa molar del sacárido del serogrupo Y en el segundo lote es Y2; (f) las relaciones A1/A2, C1/C2, W1/W2 y Y1/Y2 están cada una entre 0,95 y 1,05.

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

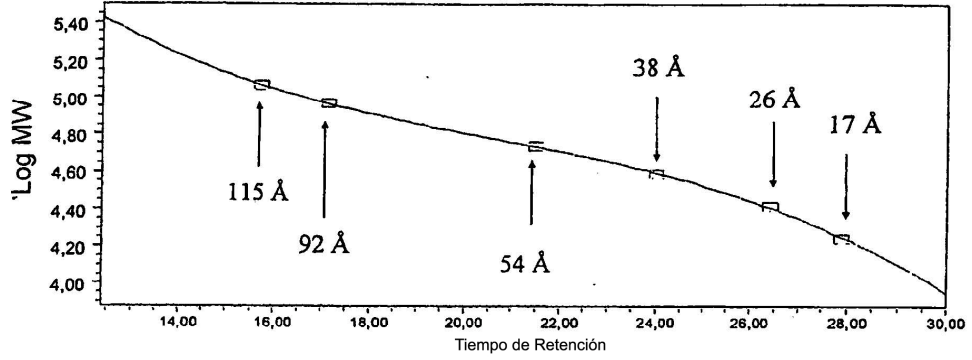


FIGURA 2

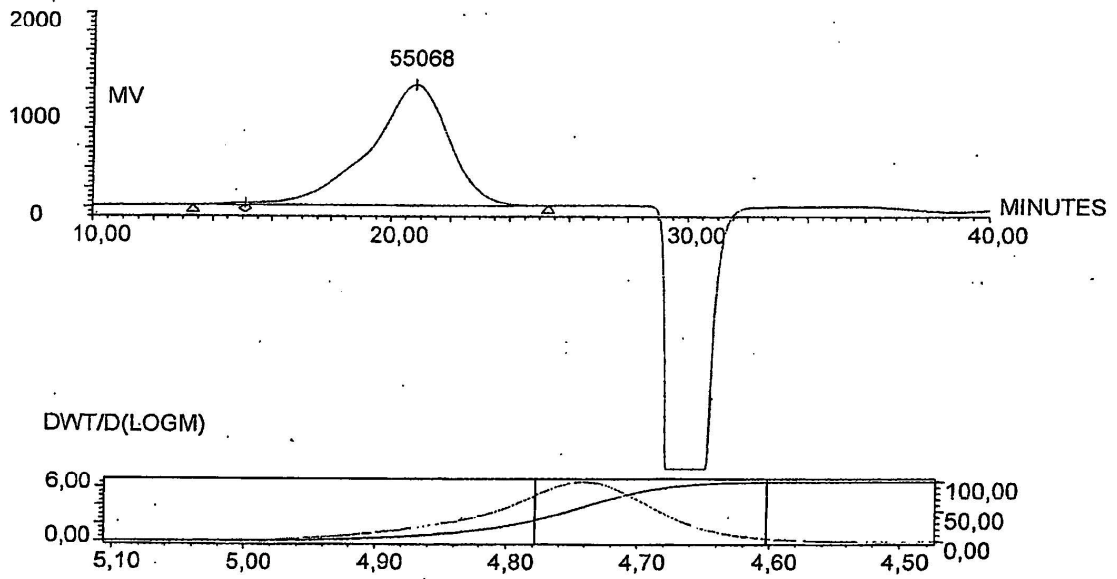


FIGURA 3

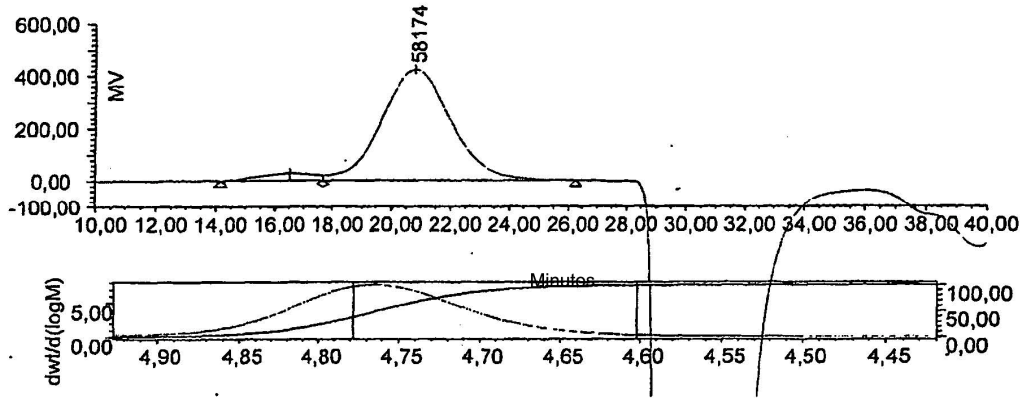


FIGURA 4

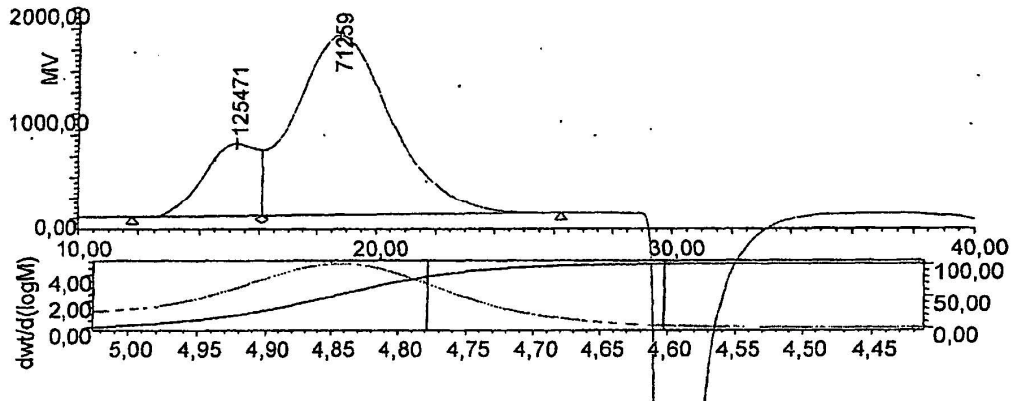


FIGURA 5

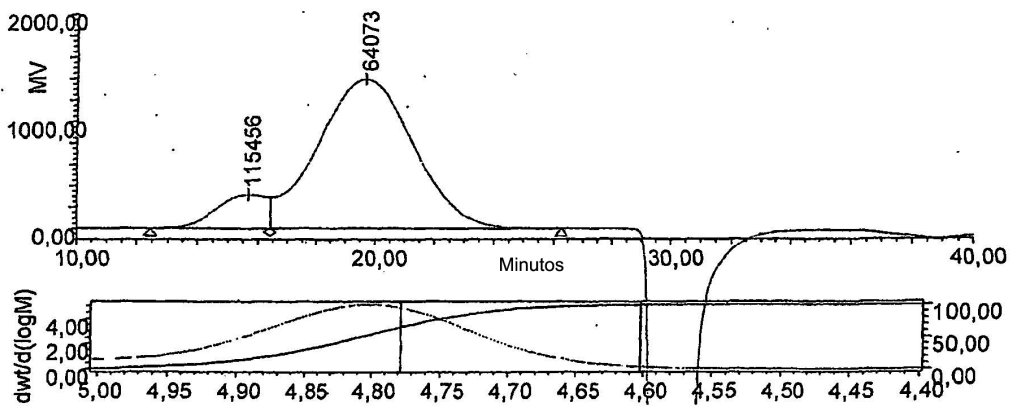


FIGURA 6

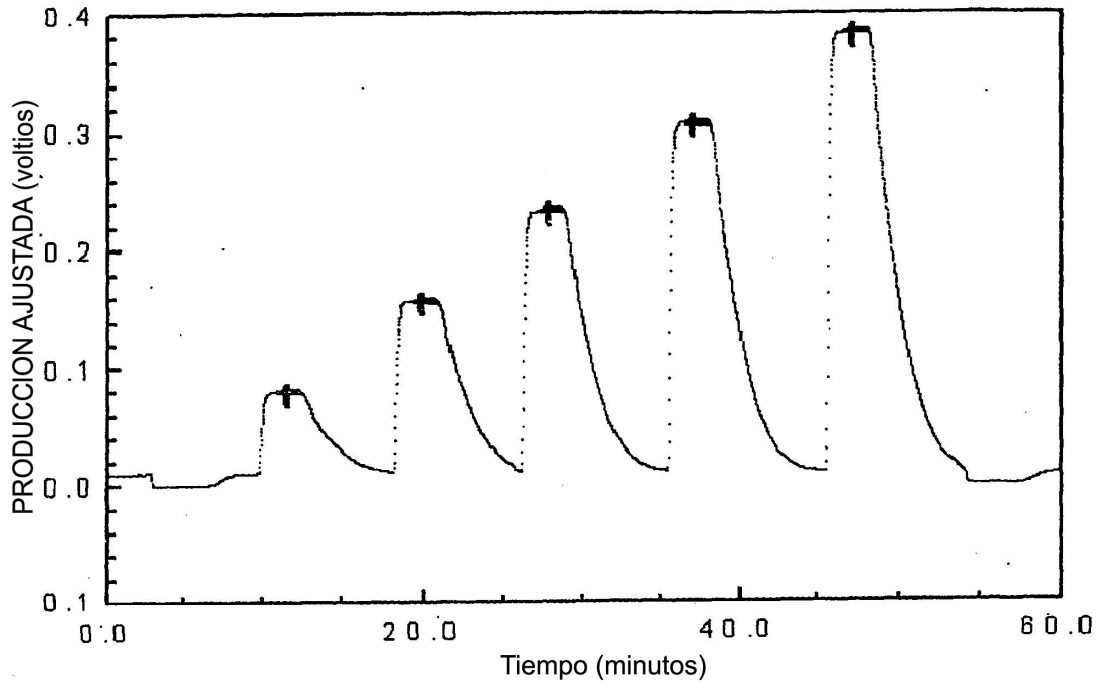


FIGURA 7

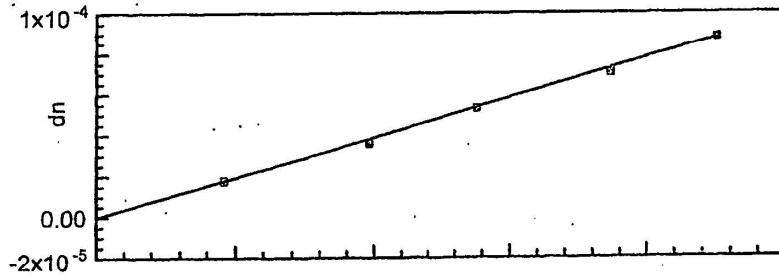


FIGURA 8

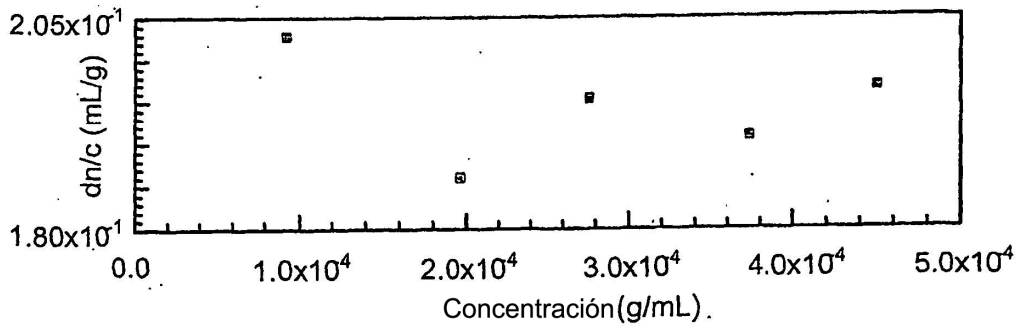


FIGURA 9

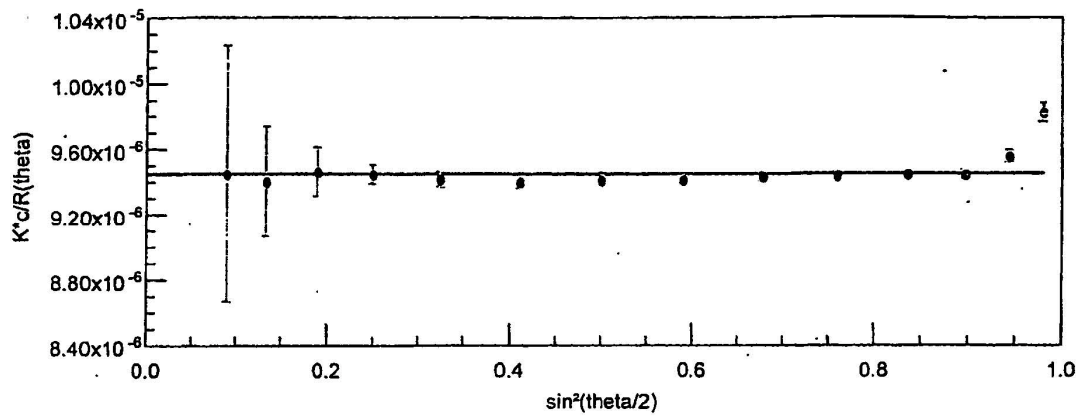


FIGURA 10

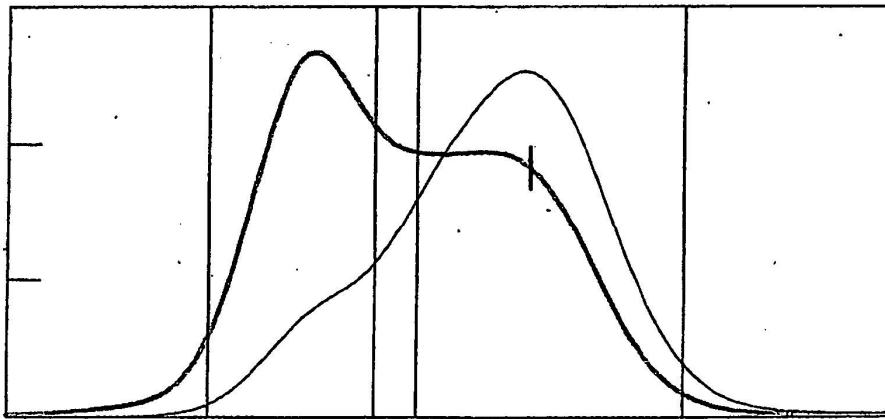


FIGURA 11

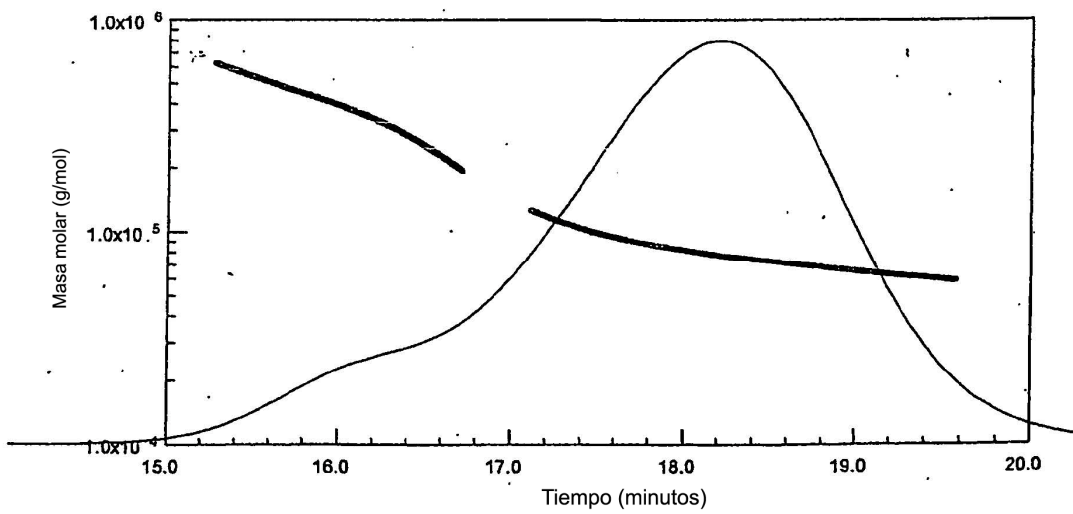


FIGURA 12

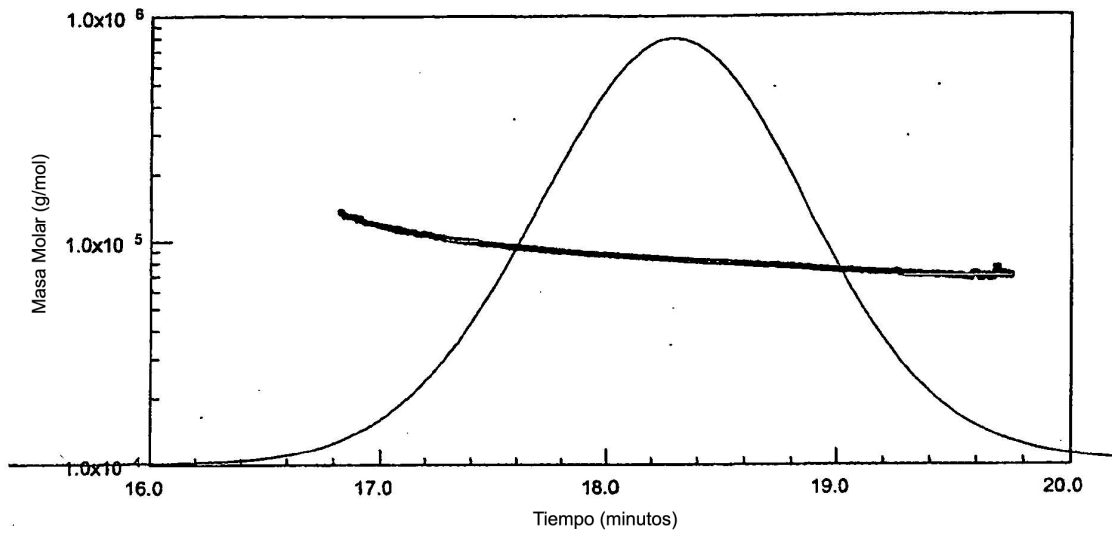


FIGURA 13

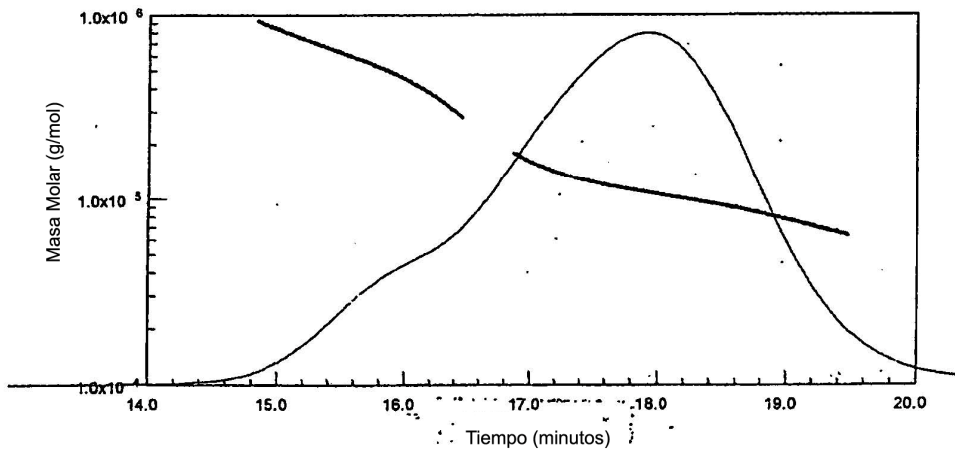


FIGURA 14

