

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 904**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2012** **E 12707745 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015** **EP 2683408**

54 Título: **Procedimiento de conjugación de un antígeno bacteriano con una proteína vehículo**

30 Prioridad:

07.03.2011 GB 201103836

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

14.07.2015

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**BIEMANS, RALPH LEON;
DUVIVIER, PIERRE y
GAVARD, OLLIVIER FRANCIS NICOLAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 540 904 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de conjugación de un antígeno bacteriano con una proteína vehículo

La presente invención se refiere a un procedimiento de conjugación, en particular mediante aminación reductora usando el agente reductor triacetoxiborohidruro de sodio. La presente invención también proporciona un procedimiento de fabricación de una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la invención.

Antecedentes

Los niños menores de 2 años de edad no desarrollan una respuesta inmunitaria a la mayor parte de las vacunas de polisacáridos, de modo que ha sido necesario obtener los inmunógenos polisacáridos mediante conjugación química con una proteína vehículo. Acoplar el polisacárido, un antígeno independiente de T, a una proteína, un antígeno dependiente de T, confiere al polisacárido las propiedades de dependencia de T que incluyen cambio de isotipos, maduración de afinidad e inducción de memoria. El *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria gram-positiva responsable de una morbilidad considerable (en particular en personas jóvenes y ancianas), que provoca enfermedades invasivas tales como neumonía, bacteremia y meningitis, y enfermedades asociadas con colonización, tales como otitis media aguda. Se estima que la tasa de neumonía por neumococos en Estados Unidos para personas de más de 60 años de edad es de 3 a 8 por 100.000. En el 20 % de los casos esta desencadena bacteremia y otras manifestaciones tales como meningitis, con una tasa de mortalidad cercana al 30 % incluso con tratamiento con antibióticos.

El neumococo está encapsulado con un polisacárido unido químicamente que confiere especificidad de serotipo. Existen 90 serotipos conocidos de neumococos y la cápsula es el determinante de virulencia principal para los neumococos, ya que la cápsula no solo protege la superficie interna de la bacteria del complemento, sino que por sí misma es poco inmunógena. Los polisacáridos son antígenos independientes de T y no pueden procesarse o presentarse en moléculas del CMH para interactuar con linfocitos T. No obstante, pueden estimular el sistema inmunitario mediante un mecanismo alternativo que implica la reticulación de receptores de superficie de linfocitos B.

Se ha mostrado en varios experimentos que la protección contra una enfermedad por neumococos invasiva está correlacionada del modo más intenso con un anticuerpo específico para la cápsula y la protección es específica del serotipo.

El *Streptococcus pneumoniae* es la causa más común de enfermedad bacteriana invasiva y de otitis media en recién nacidos y niños pequeños. Asimismo, los ancianos desarrollan unas respuestas reducidas a vacunas de neumococos [Roghmann y col., (1987), J. Gerontol. 42:265-270], de ahí la incidencia aumentada de neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

La conjugación de sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* usando iones cianoborohidruro es conocida, por ejemplo por el documento WO87/06838. No obstante, los iones cianoborohidruro tienen varias desventajas que incluyen un tiempo de reacción relativamente lento y la posible contaminación del producto con cianuro (Ahmed F. y col., J.Org.Chem., 1996, 61:3849-3862). El tiempo de reacción lento usando este reactivo se aborda en el documento EP1035137, que describe un intento de mejorar el tiempo de reacción de este procedimiento de conjugación mediante el uso de radiación de microondas.

Ahmed y col. han descrito la aminación reductora de aldehídos y cetonas con triacetoxiborohidruro de sodio ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$) (J. Org. Chem., 1996, 61:3849-3862). De forma similar, la aminación reductora de carbohidratos usando $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ se ha descrito por Dalpathado y col. (Anal. Bioanal. Chem (2005) 281:130-1137).

En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento mejorado de conjugación de un antígeno mediante aminación reductora usando aniones triacetoxiborohidruro ($\text{BH}(\text{OA})_3$) en el agente reductor. Los inventores han descubierto que este agente reductor es adecuado para su uso en la conjugación de sacáridos bacterianos con proteínas vehículo; en particular esta reacción es más rápida que la reacción equivalente usando iones cianoborohidruro y no produce subproductos tóxicos.

Sumario de la invención

En un primer aspecto de la invención se proporciona un procedimiento de conjugación de un antígeno que comprende las etapas de

a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;

b) hacer reaccionar el antígeno activado y una proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y

c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado; o

a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;

- b') hacer reaccionar el antígeno activado y un enlazador para formar un grupo imina que une el antígeno activado al enlazador;
- c') reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno-enlazador y
- 5 d) hacer reaccionar el antígeno-enlazador con una proteína vehículo para formar un antígeno conjugado;
- en el que el antígeno se origina a partir de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Vi o *Staphylococcus epidermidis*, en el que el antígeno es un sacárido capsular bacteriano y en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con peryodato.
- 10 En un segundo aspecto de la invención se proporciona un procedimiento de conjugación de un antígeno que comprende las etapas de
- a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- a') liofilizar el antígeno activado y una proteína vehículo, operación seguida por reconstitución en DMSO o DMF;
- 15 b) hacer reaccionar el antígeno activado y la proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y
- c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado; o
- a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- a') liofilizar el antígeno activado y un enlazador, operación seguida por reconstitución en DMSO o DMF;
- 20 b') hacer reaccionar el antígeno activado y el enlazador para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y
- c') reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno-enlazador;
- 25 d) hacer reaccionar el antígeno-enlazador con una proteína vehículo para formar un antígeno conjugado, en el que el antígeno es un sacárido capsular bacteriano y en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con peryodato.
- Se divulga una composición inmunógena que comprende el antígeno conjugado mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Se divulga una composición inmunógena que puede obtenerse mediante el procedimiento de la invención.
- 30 Se divulga una composición inmunógena obtenida mediante el procedimiento de la invención.
- Se divulga una vacuna que comprende dicha composición inmunógena.
- Se divulga el uso de dicha composición inmunógena en la prevención o el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo una enfermedad bacteriana.
- 35 Se divulga el uso de dicha composición inmunógena en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*, enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y enfermedad por *Salmonella*.
- Se divulga el uso de dicha composición inmunógena en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo una enfermedad bacteriana.
- 40 Se divulga el uso de dicha composición inmunógena en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*, enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y enfermedad por *Salmonella*.
- 45 Se divulga un procedimiento de prevención o de tratamiento de una infección, por ejemplo una infección bacteriana, que comprende administrar dicha composición inmunógena a un paciente.
- Se divulga un procedimiento de prevención o de tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*,

enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y enfermedad por *Salmonella* que comprende administrar dicha composición inmunógena a un paciente.

Descripción de las figuras

5 **Figura 1.** Tamaño de polisacáridos 23F y 6B después de tratamiento con peryodato. La línea marcada con triángulos muestra el tamaño de 6B en tampón de fosfato 10 mM, la línea marcada con rombos muestra el tamaño de 23F en tampón de fosfato 10 mM y la línea marcada con cuadrados muestra el tamaño de 23F en tampón de fosfato 100 mM.

10 **Figura 2.** Comparación de la inmunogenicidad de conjugados de 23F usando bien conjugación con CDAP o conjugación por aminación reductora. El gráfico a) describe el resultado de un ensayo ELISA El gráfico b) describe el resultado de un ensayo de opsonofagocitosis

Figura 3. Evaluación de la inmunogenicidad de PS06B-CRM conjugado usando los procedimientos de conjugación descritos en el ejemplo 4 en el modelo de ratones Balb/c.

Figura 4. Evaluación de la inmunogenicidad de PS06B-CRM conjugado usando los procedimientos de conjugación descritos en el ejemplo 4 en el modelo de cobayas.

15 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un procedimiento de conjugación de un antígeno con una proteína vehículo mejorado. En particular, la invención proporciona un procedimiento de conjugación de un antígeno que comprende las etapas de

- a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- 20 b) hacer reaccionar el antígeno activado y una proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y
- c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado; o
- a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- 25 b') hacer reaccionar el antígeno activado y un enlazador para formar un grupo imina que une el antígeno activado al enlazador;
- c') reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno-enlazador y
- d) hacer reaccionar el antígeno-enlazador con una proteína vehículo para formar un antígeno conjugado;

30 en el que el antígeno se origina a partir de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Vi o *Staphylococcus epidermidis*, en el que el antígeno es un sacárido capsular bacteriano y en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con peryodato.

En una realización, el procedimiento de la invención comprende las etapas a), b) y c).

La invención proporciona también un procedimiento de conjugación de un antígeno que comprende las etapas de

- 35 a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- a') liofilizar el antígeno activado y una proteína vehículo, operación seguida por reconstitución en DMSO o DMF;
- b) hacer reaccionar el antígeno activado y la proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo; y
- c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado; o
- 40 a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- a') liofilizar el antígeno activado y un enlazador, operación seguida por reconstitución en DMSO o DMF;
- b') hacer reaccionar el antígeno activado y el enlazador para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo; y
- 45 c') reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un

antígeno-enlazador;

d) hacer reaccionar el antígeno-enlazador con una proteína vehículo para formar un antígeno conjugado,

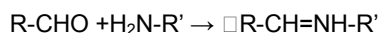
en el que el antígeno es un sacárido capsular bacteriano y en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con peryodato.

5 En otra realización, el procedimiento de la invención comprende las etapas a), a'), b) y c).

Para los fines de la invención, la expresión "activar el antígeno" se refiere a cualquier proceso que introduce grupos carbonilo en los antígenos, en particular la oxidación con peryodato.

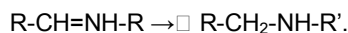
Para los fines de la invención, la expresión "antígeno activado" se refiere a un antígeno que se ha modificado mediante el procedimiento de "activar el antígeno".

10 Las etapas b) o b') pueden realizarse mediante el siguiente esquema de reacción:



en el que R-CHO es el antígeno y H₂N-R' es la proteína vehículo.

Las etapas c) o c') pueden realizarse mediante el siguiente esquema de reacción:



15 Un agente reductor es un agente que es capaz de reducir un grupo imina, preferentemente el agente reductor reduce grupos imina dando preferentemente grupos aldehído. Los agentes reductores de la invención comprenden un resto triacetoxiborohidruro (BH(OAc)₃), por ejemplo los agentes reductores de la invención pueden comprender triacetoxiborohidruro de sodio (Na-BH(OAc)₃) o triacetoxiborohidruro de potasio (KBH(OAc)₃). Preferentemente, el agente reductor no contiene un resto cianoborohidruro, preferentemente el agente reductor no comprende cianoborohidruro de sodio.

Para los fines de la invención la expresión "antígeno conjugado" indica un antígeno unido covalentemente a una proteína vehículo.

25 La liofilización del antígeno activado y la proteína vehículo puede referirse a una coliofilización, es decir, mezclar el antígeno activado y la proteína vehículo entre sí y liofilizarlos en el mismo recipiente, o puede referirse a liofilizar el antígeno activado y la proteína vehículo por separado y combinarlos entre sí después de la liofilización.

En una realización el antígeno es un sacárido bacteriano. En otra realización el antígeno es un sacárido capsular bacteriano.

30 El término "sacárido" a lo largo de la presente memoria descriptiva puede indicar polisacárido, oligosacárido o ácido teicoico, e incluye los tres. Puede indicar lipopolisacárido (LPS) o lipooligosacárido (LOS). Antes de su uso los polisacáridos pueden aislarse de una cepa fuente o pueden aislarse de una cepa fuente y modificarse su tamaño en alguna medida mediante procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, los documentos EP497524 y EP497525; Shousun Chen Szu y col. - Carbohydrate Research Vol 152 p 7-20 (1986)) por ejemplo por microfluidización. Los oligosacáridos tienen un número reducido de unidades de repetición (normalmente 5-30 unidades de repetición).

35 En una realización el sacárido bacteriano se origina a partir de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Salmonella* Vi o *S. epidermidis*. En otra realización el sacárido bacteriano se origina a partir de *S. pneumoniae*, *H. Influenzae* o *N. meningitidis*. En otra realización el sacárido bacteriano se origina a partir de *H. influenzae*. En otra realización más el sacárido bacteriano es un sacárido capsular bacteriano seleccionado de una lista que consiste en: *N. meningitidis* serogrupo A (MenA), B (MenB), C (MenC), W135 (MenW) o Y (MenY), estreptococos de grupo B grupo Ia, Ib, II, III, IV, V, VI o VII, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella typhi* (sacárido Vi), *Vibrio cholerae*, *H. influenzae* tipo b y de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F.

40 En otra realización el sacárido capsular bacteriano es de un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en 5, 6B, 6A, 7F, 9V, 14, 19F y 23F. En una realización, el sacárido capsular bacteriano es el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 23F. En una realización, el sacárido capsular bacteriano es el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6B. En una realización, el sacárido capsular bacteriano es el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6A.

En otra realización el sacárido bacteriano es un polisacárido o un oligosacárido de *Haemophilus influenzae* b (Hib).

45 La expresión "proteína vehículo" se pretende que abarque tanto péptidos pequeños como polipéptidos grandes (> 10 kDa). La proteína vehículo puede ser cualquier péptido o proteína. Puede comprender uno o más epítopes T colaboradores. La proteína vehículo puede ser el toxoide del tétanos (TT), el fragmento C del toxoide del tétanos,

mutantes no tóxicos del toxoide del tétanos [nótese que se considera que todas dichas variantes de TT son el mismo tipo de proteína vehículo para los fines de la presente invención], toxoide de la difteria (DT), CRM197, otros mutantes no-tóxicos de la toxina de la difteria [tales como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida y col. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en *Genetically Engineered Toxins*, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delección o mutación de Glu-148 a Asp, Gin o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones divulgadas en los documentos US 4709017 o US 4950740; mutación de al menos uno o más residuos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones divulgadas en los documentos US 5917017 o US 6455673; o un fragmento divulgado en el documento US 5843711] (nótese que se considera que todas dichas variantes de DT son el mismo tipo de proteína vehículo para los fines de la presente invención), neumolisina de neumococos (Kuo y col. (1995) *Infect Immun* 63; 2706-13), OMPC (proteína de membrana exterior de meningococos (extraída habitualmente a partir de *N. meningitidis* serogrupo B) documento EP0372501), péptidos sintéticos (documento EP0378881, documento EP0427347), proteínas de choque térmico (documento WO 93/17712, documento WO 94/03208), proteínas de *pertussis* (documento WO 98/58668, documento EP0471177), citocinas, linfocinas, factores del crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopes de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31; 3816-3824) tales como la proteína N19 (Baraldoi y col. (2004) *Infect Immun* 72; 4884-7) proteína de superficie de neumococos PspA (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761), proteína D de *H. influenzae* (documentos EP594610 y WO 00/56360), PhtA de neumococos (documento WO 98/18930, también denominada Sp36), PhtD de neumococos (divulgada en el documento WO 00/37105 y denominada también Sp036D), PhtB de neumococos (divulgada en el documento WO 00/37105 y denominada también Sp036B) o PhtE (divulgada en el documento WO00/30299 y denominada BVH-3).

En una realización de la presente invención la proteína vehículo se selecciona del grupo que consiste en: toxoide del tétanos (TT), fragmento C del toxoide del tétanos, toxoide de la difteria (DT), CRM197, neumolisina (Ply), proteína D, PhtD, PhtDE y N19. En otra realización la proteína vehículo es CRM197. En otra realización más la proteína vehículo es el toxoide del tétanos.

En una realización el antígeno se conjuga directamente con la proteína vehículo. En otra realización el antígeno se conjuga con la proteína vehículo mediante la adición de un enlazador heterobifuncional u homobifuncional usando la química de la invención. Un extremo del enlazador reaccionará con el antígeno activado mediante aminación reductora; sin embargo el otro extremo del enlazador puede reaccionar con la proteína vehículo usando cualquier tipo de química. Por esta razón, el enlazador contendrá al menos un grupo amino reactivo, si el enlazador es homobifuncional contendrá dos grupos amino reactivos, si el enlazador es heterobifuncional contendrá un grupo amino reactivo y un grupo reactivo diferente; en una realización este segundo grupo reactivo es un grupo carbonilo reactivo. En una realización el enlazador tiene entre 1 y 20 angstroms de longitud. En otra realización el enlazador tiene entre 4 y 20, entre 4 y 12 o entre 5 y 10 átomos de carbono. Un enlazador posible es dihidrazida del ácido adipico (ADH). Otros enlazadores incluyen B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever y col. (1979) *Med. Microbiol. Immunol.* 165; 171-288), haluros de haloalquilo (documento US4057685), enlaces glicosídicos (documento US4673574, documento US4808700), hexanodiamina y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286).

En general, como el segundo grupo reactivo se pueden usar los tipos siguientes de grupos químicos de la proteína vehículo para un acoplamiento/una conjugación:

A) Carboxilo (por ejemplo por medio de ácido aspártico o de ácido glutámico). En una realización este grupo se une a un grupo amino o a un enlazador con química de carbodiimida, por ejemplo con EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)). Nota: En vez de la EDAC anterior, puede usarse cualquier carbodiimida adecuada.

B) Grupo amino (por ejemplo por medio de lisina). En una realización este grupo se une a un grupo carboxilo de un enlazador con química de carbodiimida, por ejemplo con EDAC. En otra realización este grupo se une a enlazadores que tienen grupos hidroxilo activados con CDAP o CNBr; o un grupo carbonilo; o un grupo éster de succinimida.

C) Sulfhidrilo (por ejemplo por medio de cisteína). En una realización este grupo se une a un enlazador bromoacetilado o cloroacetilado o a un enlazador que tiene grupos maleimida.

D) La proteína podría modificarse para que contenga un grupo alquilino o azida; este podría conjugarse al enlazador usando la química "clic" (descrita en *Tetrahedron letters* (Junio 2005) 46:4479-4482).

En una realización, las etapas b) y c) o b') y c') tiene lugar simultáneamente.

En otra realización la etapa c) y/o la etapa c') y/o la etapa b) y/o la etapa b') se llevan a cabo en presencia de un disolvente no acuoso. En otra realización la etapa c) y/o la etapa c') y/o la etapa b) y/o la etapa b') se llevan a cabo en un disolvente está esencialmente exento de agua. Por ejemplo, la reacción puede tener lugar en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) o de dimetilformamida (DMF). En una realización la etapa c) y/o la etapa c') y/o la etapa b)

y/o la etapa b') tienen lugar en una solución que consiste esencialmente en DMSO o DMF. Si la proteína vehículo y el antígeno activado se han liofilizado, pueden usarse DMSO o DMF para reconstituir la proteína vehículo y el antígeno activado.

5 En una realización la etapa c) y/o la etapa c') tienen lugar en menos de 30 horas, menos de 25 horas, menos de 20 horas, menos de 19 horas, menos de 18 horas o menos de 17 horas.

En una realización la etapa c) y/o la etapa c') tienen lugar en un periodo de entre 15 min y 30 horas, entre 10 horas y 25 horas, entre 8 horas y 20 horas, entre 10 horas y 20 horas o entre 14 horas y 19 horas. En otra realización la etapa c) y/o la etapa c') tienen lugar en aproximadamente 16 horas.

10 En una realización la etapa c) y/o la etapa c') no dan como resultado la producción de iones cianuro. Por ejemplo, la aminación reductora usando un agente reductor que comprende un resto cianoborohidruro puede dar como resultado la producción de iones cianuro; estos pueden ser tóxicos si se usan en vacunación.

En una realización el antígeno y la proteína vehículo se mezclan entre sí antes de la etapa b). Esto puede tener lugar durante la etapa a'), pero en general la proteína vehículo y el antígeno se mezclarán entre sí después de la etapa a).

15 En una realización el antígeno y la proteína vehículo se liofilizan antes de la etapa b), preferentemente esto tiene lugar después de la etapa a). En una realización el antígeno activado se liofiliza después de la etapa a), la proteína vehículo también se liofiliza y el antígeno activado y la proteína vehículo se reconstituyen en la misma solución; esto actúa como mezclado del antígeno y la proteína vehículo entre sí.

20 En una realización la liofilización tiene lugar en presencia de un azúcar no reductor; los posibles azúcares no reductores incluyen sacarosa, lactosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una realización el azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa y manitol.

25 En una realización se usan entre 0,2 y 5, entre 0,5 y 3 o entre 0,9 y 2,6, entre 0,5 y 0,8, entre 0,2 y 1,0, entre 2 y 3 o entre 1 y 4 equivalentes molares de agente reductor en la etapa c) o la etapa c'). Para los fines de la invención, el uso de 1 equivalente molar de agente reductor corresponde al uso de un mol de agente reductor por un mol de unidades de repetición del sacárido. En otra realización se usan aproximadamente 2,5 equivalentes molares o entre 1 y 3 equivalentes molares de agente reductor en la etapa c) o la etapa c').

30 En una realización la relación proteína vehículo:antígeno antes de la etapa c) y/o la etapa c') se encuentra entre 0,4:1 y 2:1. En una realización la relación proteína vehículo:antígeno antes de la etapa c) y/o la etapa c') se encuentra entre 1:1 y 2:1. En otra realización la relación proteína vehículo:antígeno antes de la etapa c) y/o la etapa c') para PS23F o PS6B se encuentra entre 1:1 y 2:1, entre 0,4:1 y 2,5:1, entre 2,0:1 y 2,5:1 o entre 0,2:1 y 1,5:1. En una realización la relación proteína vehículo:antígeno después de la etapa c) y/o la etapa c') se encuentra entre 0,8:1 y 3,5:1. En una realización la relación proteína vehículo:antígeno después de la etapa c) y/o la etapa c') se encuentra entre 1,3:1 and 2,7:1. En otra realización la relación proteína vehículo:antígeno después de la etapa c) y/o la etapa c') se encuentra entre 1:1 y 1,5:1.

35 Al finalizar la etapa c) o la etapa c') puede haber presencia de grupos carbonilo sin reaccionar remanentes en los antígenos conjugados; se puede terminar la cadena de los mismos con agentes de terminación de cadena. En una realización este agente de terminación de cadena es borohidruro de sodio (NaBH_4); por ejemplo el producto de la etapa c) o la etapa c') puede hacerse reaccionar con borohidruro de sodio durante 15 min-15 h, 15 min-45 min, 2-10 h o 3,5 h, aproximadamente 30 min o aproximadamente 4 h. En otra realización, la terminación de cadena se logra mezclando el producto de la etapa c) con 1 a 10 equivalentes molares, entre 1 a 5, entre 1,5 y 2,5, a aproximadamente 2 equivalentes molares de NaBH_4 . En una realización la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con peryodato. El término "peryodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico. Este término también incluye tanto metaperyodato (IO_4^-) como ortoperyodato (IO_6^{5-}); no obstante, en una realización particular el peryodato usado en el procedimiento de la invención es metaperyodato. El término "peryodato" también incluye las diversas sales de peryodato incluidos el peryodato de sodio y el peryodato de potasio. En una realización el peryodato usado es metaperyodato de sodio. Cuando un antígeno reacciona con peryodato, el peryodato oxida grupos hidroxilo vecinales para formar grupos carbonilo o aldehído y provoca la escisión de un enlace C-C. Por este motivo, la expresión "hacer reaccionar un antígeno con peryodato" incluye la oxidación de grupos hidroxilo vecinales mediante el peryodato.

50 En una realización la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con 0,001-0,7, 0,005-0,5, 0,01-0,5, 0,1-1,2, 0,1-0,5, 0,1-0,2, 0,5-0,8, 0,1-0,8, 0,3-1,0 o 0,4-0,9 equivalentes molares de peryodato; en otra realización la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con 0,0001-0,8 equivalentes molares de peryodato.

55 En una realización el tampón usado en la etapa a) es un tampón que no contiene un grupo amina. En una realización el tampón se selecciona de la lista que consiste en tampón de fosfato, tampón de borato, tampón de acetato, tampón de carbonato, tampón de maleato y tampón de citrato. En una segunda realización el tampón es un tampón inorgánico. La expresión tampón inorgánico incluye cualquier solución de tampón en la que la capacidad tamponadora se deba a la presencia de un compuesto que no contiene carbono. Los tampones inorgánicos de la

invención incluyen tampón de fosfato y tampón de borato. En una realización el tampón es tampón de fosfato.

En una realización el tampón tiene una concentración de 1-100 mM, 5-80 mM, 1-50 mM, 1-25 mM, 10-40 mM, 1-10 mM, 5-15 mM, 8-12 mM, 10-20 mM, 5-20 mM, 10-50 mM, o aproximadamente 10 mM o aproximadamente 20 mM. En otra realización el pH de la etapa a) es un pH de 3,0-8,0, un pH de 5,0-7,0, un pH de 5,5-6,5, un pH de 5,8-6,3 o un pH de aproximadamente 6,0.

En una realización la etapa a) se lleva a cabo en la oscuridad, por ejemplo el recipiente que contiene la mezcla de reacción puede cubrirse con un material capaz de reflejar la luz, por ejemplo una película de aluminio.

El antígeno puede ser un sacárido bacteriano nativo o puede ser un sacárido bacteriano al que se ha reducido su tamaño en un factor de no más de x2, x4, x6, x8, x10 o x20 (por ejemplo por microfluidización [por ejemplo con el aparato Emulsiflex C-50] u otra técnica conocida [por ejemplo procedimientos térmicos, químicos, por oxidación o por sonicación]). En una realización el antígeno es un sacárido bacteriano que se microfluidiza antes de la etapa a). Se pueden haber reducido de tamaño los oligosacáridos sustancialmente aún más [por ejemplo mediante procedimientos térmicos, químicos o por oxidación].

Para los fines de la invención, "sacárido bacteriano nativo" se refiere a un sacárido bacteriano que no se ha sometido a un procedimiento cuyo fin sea reducir el tamaño del sacárido. El tamaño de un sacárido bacteriano puede reducirse ligeramente durante procedimientos de purificación normales. Dicho sacárido es todavía nativo. Solo si el sacárido bacteriano se ha sometido a técnicas que reducen el tamaño de un sacárido no se consideraría nativo al polisacárido.

El peso molecular promedio en peso de un sacárido bacteriano adecuado para su conjugación en el procedimiento de la invención puede encontrarse entre 20 kDa y 2000 kDa, entre 30 kDa y 1000 kDa, entre 40 kDa y 500 kDa, entre 50 kDa y 400 kDa, entre 75 kDa y 300 kDa o entre 1000 kDa y 2000 kDa. En el caso del sacárido capsular 23F nativo de *S.pneumoniae*, el peso molecular promedio del polisacárido nativo se encuentra entre 750-1500 kDa o entre 1200-1300 kDa. En el caso del sacárido Hib nativo, el peso molecular promedio del polisacárido nativo se encuentra entre 100 y 250 kDa. El peso molecular o el peso molecular promedio de un sacárido se refiere en el presente documento al peso molecular promedio en peso (Mw) del sacárido bacteriano medido antes de la conjugación y se mide mediante MALLS. La técnica MALLS es bien conocida en la técnica. Los análisis MALLS pueden llevarse a cabo usando un TSKGMPwxi y Na/KPO₄ 50 mM, NaCl 200 mM, pH de 7,0, como tampón de elución con 0,75 ml/min usando un detector RI/DAWN-EOS. En una realización, la polidispersidad de un sacárido bacteriano es 1-1,5, 1-1,3, 1-1,2, 1-1,1 o 1-1,05 y después de la conjugación con la proteína vehículo, la polidispersidad del sacárido bacteriano conjugado es 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5, 1,0-1,2, 1,5-2,5, 1,7-2,2 o 1,5-2,0. Todas las mediciones de la polidispersidad se generan por MALLS.

El tratamiento con peryodato puede provocar una reducción del tamaño del sacárido bacteriano (efecto de cambio de tamaño). En una realización el procedimiento de la invención reduce este efecto de cambio de tamaño. Esto se observa para el sacárido bacteriano 23F de *Streptococcus pneumoniae* (como en el ejemplo 1). Por este motivo, en una realización el peso molecular promedio de un sacárido bacteriano de la invención se encuentra entre 1-1100 kDa, 100-470 kDa, 200-300 kDa, 600-1100 kDa o 800-1000 kDa después de la etapa a) (medido por MALLS como se ha descrito anteriormente). En una realización el peso molecular promedio del sacárido 23F se encuentra entre 100-470 kDa o entre 200-300 kDa después de la etapa a). En una realización el peso molecular promedio del sacárido bacteriano 23F se encuentra entre 1 y 50 kDa o entre 5 y 10 kDa después de la etapa a).

La invención también proporciona una etapa adicional e) de purificación del antígeno conjugado, la etapa e) puede comprender diafiltración, por ejemplo diafiltración con un corte de 100 kDa. Adicionalmente o como alternativa, la etapa e) puede comprender cromatografía de intercambio. En otra realización la etapa e) puede comprender cromatografía de exclusión por tamaño. En otra realización la etapa e) puede comprender purificar al antígeno conjugado usando permeación en gel. En una realización el procedimiento comprende una etapa adicional f), en la que el conjugado se filtra de forma estéril.

El antígeno conjugado también puede mezclarse con antígenos adicionales. En una realización los antígenos adicionales comprenden al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sacáridos de *S.pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C y 19F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 4, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 19F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de

S.pneumoniae 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 19F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S.pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

- 5 Cualquiera de los sacáridos enumerados como "antígenos adicionales" se conjugan opcionalmente con una proteína vehículo bien mediante el procedimiento de la invención o bien mediante un procedimiento diferente. Opcionalmente estos antígenos adicionalmente se conjugan con las proteínas vehículo enumeradas anteriormente.

- En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 1 de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 3 de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D, CRM197, neumolisina o PhtD o un fragmento o proteína de fusión de las mismas. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 4 de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 5 de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 6B de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 7F de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 9V de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 14 de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 23F de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 18C de *S. pneumoniae* conjugado con el toxoide del tétanos o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 19A de *S. pneumoniae* conjugado con neumolisina D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 22F de *S. pneumoniae* conjugado con CRM197 o PhtD o un fragmento o proteína de fusión de las mismas. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 6A de *S. pneumoniae* conjugado con neumolisina o una proteína de *H. influenzae*, opcionalmente la proteína D o PhtD o una proteína de fusión de las mismas o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 6C de *S. pneumoniae* conjugado con neumolisina o una proteína de *H. influenzae*, opcionalmente la proteína D o PhtD o una proteína de fusión de las mismas o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 19F de *S. pneumoniae* conjugado con el toxoide de la difteria (DT).

- 30 Los antígenos adicionales también comprenden proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. En una realización los antígenos adicionales comprenden al menos 1 proteína seleccionada del grupo que consiste en la familia tríada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia de LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncado de CbpX-truncado de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133. En una realización los antígenos adicionales comprenden PhtD y/o Ply.

- 35 Los antígenos adicionales pueden comprender también antígenos de otras especies bacterianas. En una realización la vacuna o composición inmunógena comprende antígenos originarios de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *E.coli*, *M.cattarhalis*, tétanos, difteria, tos ferina, *S.epidermidis*, enterococos, pseudomonas o *S. aureus*.

- En una realización los antígenos adicionales comprenden antígenos de *M.cattarhalis*; los antígenos preferentes de *M.cattarhalis* son: OMP106 [documento WO 97/41731 (Antex) y documento WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA y LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y TbpB [documentos WO 97/13785 y WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME. y col. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1/2 [documento WO 93/03761 (Universidad de Texas)] y OmpCD. Los ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* no tipificables que pueden incluirse en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media) incluyen: proteína fimbrina [(documento US 5766608 - Ohio State Research Foundation (Fundación de Investigación del Estado de Ohio)] y fusiones que comprenden péptidos de los mismos [por ejemplo fusiones peptídicas LB1(f); documento US 5843464 (OSU) o documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University of New York (Universidad Estatal de Nueva York))]; TbpA y TbpB; Hia; Hmw1,2; Hap; y D15.

- En otra realización los antígenos adicionales comprenden toxoide de la difteria (DT), toxoide del tétano (TT) y componentes de tos ferina [normalmente toxoide de tos ferina (PT) destoxificado y hemaglutina filamentosa (FHA) con pertactina opcional (PRN) y/o aglutinina 1+2 y/o aglutinógeno 1+2], por ejemplo la vacuna comercializada INFANRIX-DTPaTM (Smith- KlineBeecham Biologicals) que contiene antígenos DT, TT, PT, FHA y PRN o con un componente de tos ferina de célula completa, por ejemplo comercializado por SmithKlineBeecham Biologicals s.a., como TritanrixTM. En otra realización los antígenos adicionales comprenden antígeno de superficie de la hepatitis B (HepB).

En otra realización los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular PRP de *H.influenzae* (Hib).

- 55 En otra realización los antígenos adicionales comprenden al menos un sacárido capsular de *N.meningitidis* A, C, W o Y. En otra realización los antígenos adicionales comprenden al menos un conjugado de un sacárido capsular de *N.meningitidis* A, C, W, Y o B.

El antígeno conjugado también puede mezclarse con un coadyuvante. Los coadyuvantes adecuados incluyen, pero

sin limitación, sales de aluminio (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), monofosforil-lípido A (por ejemplo 3D-MPL), saponinas (por ejemplo QS21), emulsicones de aceite en agua, protuberancias o preparaciones de vesícula de membrana exterior de cepas bacterianas Gram negativas (tales como las enseñadas por el documento WO02/09746), lípido A o derivados del mismo, fosfatos de alquilglucosamida o combinaciones de dos o más de estos coadyuvantes.

En otra realización el antígeno conjugado de la invención se mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una composición inmunógena.

En el presente documento se divulga una composición inmunógena que puede obtenerse mediante el procedimiento de la invención. En el presente documento se divulga una composición inmunógena obtenida mediante el procedimiento de la invención. En una realización el excipiente farmacéuticamente aceptable no contiene cloruro de sodio. En una realización el excipiente farmacéutico comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en fosfato, maleato, tris o citrato. En otra realización el tampón es tampón de maleato.

La composición inmunógena puede comprender antígenos adicionales, en particular los descritos como "antígenos adicionales" anteriormente. La composición inmunógena puede comprender un coadyuvante. En una realización el coadyuvante es una sal de aluminio.

En el presente documento también se divulga una vacuna que comprende la composición inmunógena.

Las preparaciones de vacuna que contienen dichas composiciones inmunogénicas pueden usarse para proteger o tratar a un mamífero susceptible de infección, mediante la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir la inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por medio de administración mucosal a los aparatos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Es posible la administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos puede evitarse más eficazmente, atenuando así la infección en su fase más temprana). Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como una dosis unitaria, los componentes de la misma se pueden coadministrar conjuntamente al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo los conjugados de sacáridos de neumococos pueden administrarse por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración del componente proteico bacteriano cualquiera de la vacuna para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias unas con respecto a otras). Además de una sola vía de administración, se pueden usar dos vías diferentes de administración. Por ejemplo, los sacáridos o los conjugados de sacáridos se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas se pueden administrar IM para dosis de sensibilización e IN para dosis de refuerzo.

El contenido de antígenos proteicos en la vacuna se encontrará normalmente en el intervalo de 1-100 µg, opcionalmente de 5-50 µg, del modo más típico en el intervalo de 5-25 µg. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

La preparación de vacunas se describe, en general, en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación por liposomas se describe por Fullerton, patente de Estados Unidos N° 4.235.877. Aunque las vacunas divulgadas en el presente documento pueden administrarse por cualquier vía, la administración de las vacunas descritas en el interior de la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula "callosa" exterior, denominada estrato córneo, que recubre la epidermis. Por debajo de dicha epidermis se encuentra una capa denominada dermis, que a su vez recubre el tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna en el interior de la piel, y en particular en la dermis, estimula una respuesta inmunitaria que también puede estar asociada con una serie de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en el presente documento forma una característica opcional.

La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento de Mantoux", comprende etapas de limpieza de la piel y después estiramiento con la mano, y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) orientado hacia arriba se inserta la aguja a un ángulo de entre 10-15°. Una vez se ha insertado el bisel de la aguja, el cilindro de la aguja se introduce y avanza más mientras se proporciona una ligera presión para elevarlo por debajo de la piel. Después se inyecta el líquido muy lentamente formando de este modo una protuberancia o un bulto en la superficie de la piel, operación seguida por una retirada lenta de la aguja.

Más recientemente se han descrito dispositivos que se diseñan específicamente para administrar agentes líquidos en, o a lo largo de, la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección de chorro descritos, por ejemplo, en los documentos WO 01/13977; US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639, US 4.596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los procedimientos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales o dispositivos diseñados para la administración balística de vacunas sólidas (documento WO 99/27961) o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037) o aplicados a la superficie de la piel

(administración transdérmica o transcutánea (documentos WO 98/20734; WO 98/28037)).

Si las vacunas divulgadas en el presente documento se van a administrar en la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna se encuentra en un volumen de líquido reducido, particularmente un volumen de entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

- 5 El contenido de antígenos en las vacunas de uso dérmico o intradérmico puede ser similar a dosis convencionales tal como se encuentran en vacunas de uso intramuscular (véase anteriormente). No obstante, es una característica de vacunas de uso dérmico o intradérmico que las formulaciones pueden ser de "dosis baja". En consecuencia, los antígenos proteicos en vacunas de "dosis baja" están presentes opcionalmente en una cantidad de tan solo 0,1 a 10 μg o de 0,1 a 5 μg por dosis; y los antígenos sacáridos (opcionalmente conjugados) pueden estar presentes en una cantidad en el intervalo de 0,01-1 μg o de entre 0,01 y 0,5 μg de sacárido por dosis.

- 10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "administración intradérmica" significa administrar la vacuna a la región de la dermis en la piel. No obstante, la vacuna no se ubicará necesariamente de forma exclusiva en la dermis. La dermis es la capa de la piel localizada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm de la superficie de la piel humana, pero existe una determinada cantidad de variación entre individuos y entre diferentes partes del organismo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis a 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis se localiza entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea inferior. Dependiendo del modo de administración, la vacuna puede ubicarse, en última instancia, única o principalmente dentro de la dermis, o puede distribuirse, en última instancia, dentro de la epidermis y la dermis.

- 15 En el presente documento se describe un kit de vacuna que comprende un vial que contiene una composición inmunógena tal como se describe en el presente documento opcionalmente en forma liofilizada y que además comprende un vial que contiene un coadyuvante tal como se describe en el presente documento. Se prevé que el coadyuvante se use para reconstituir la composición inmunógena liofilizada.

- 20 En el presente documento se divulga un procedimiento de prevención o de tratamiento de una infección, por ejemplo una infección bacteriana, que comprende administrar a un huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunógena o la vacuna o el kit. También se divulga en el presente documento un procedimiento de prevención o de tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*, enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y enfermedad por *Salmonella* que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunógena o la vacuna o el kit tal como se divulgan en el presente documento.

- 25 También se divulga en el presente documento una composición inmunógena para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, por ejemplo una enfermedad bacteriana. Otro aspecto de la invención es dicha composición inmunógena para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*, enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y enfermedad por *Salmonella*.

- 30 También se divulga en el presente documento el uso de la composición inmunógena o la vacuna o el kit en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, por ejemplo una enfermedad bacteriana. Otro aspecto de la divulgación es el uso de dicha composición inmunógena o la vacuna o el kit en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*, enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y enfermedad por *Salmonella*.

"Aproximadamente" se define como dentro del 10 % más o menos de la cifra dada para los fines de la invención.

- 35 Los inventores pretenden que los términos y las expresiones "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento puedan sustituirse opcionalmente por los términos o las expresiones "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

Las realizaciones que se refieren en el presente documento a "composiciones de vacuna" se pueden aplicar también a realizaciones relacionadas con "composiciones inmunógenas" y viceversa.

- 40 Con el fin de que la presente invención pueda entenderse mejor, se exponen los ejemplos siguientes. Estos ejemplos son con fines de ilustración.

En los párrafos numerados subsiguientes se describen con más detalle realizaciones de la invención.

Párrafo 1. Un procedimiento de conjugación de un antígeno que comprende las etapas de:

- a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;

b) hacer reaccionar el antígeno activado y una proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y

c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado; o

5 a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;

b') hacer reaccionar el antígeno activado y un enlazador para formar un grupo imina que une el antígeno activado al enlazador;

c') reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno-enlazador y

10 d) hacer reaccionar el antígeno-enlazador con una proteína vehículo para formar un antígeno conjugado;

en el que el antígeno se origina a partir de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Vi o *Staphylococcus epidermidis*.

Párrafo 2. El procedimiento del párrafo 1 que comprende las etapas de

15 a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;

b) hacer reaccionar el antígeno activado y una proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y

c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado;

20 en el que el antígeno se origina a partir de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Vi o *Staphylococcus epidermidis*.

Párrafo 3. Un procedimiento de conjugación de un antígeno que comprende las etapas de:

a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;

25 a') liofilizar el antígeno activado y una proteína vehículo, operación seguida por reconstitución en DMSO o DMF;

b) hacer reaccionar el antígeno activado y la proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y

c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado; o

30 a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;

a') liofilizar el antígeno activado y un enlazador, operación seguida por reconstitución en DMSO o DMF;

b') hacer reaccionar el antígeno activado y el enlazador para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y

35 c') reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno-enlazador;

d) hacer reaccionar antígeno-enlazador con una proteína vehículo para formar un antígeno conjugado.

Párrafo 4. El procedimiento del párrafo 3 que comprende las etapas de

a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;

a') liofilizar el antígeno activado y una proteína vehículo, operación seguida por reconstitución en DMSO o DMF;

40 b) hacer reaccionar el antígeno activado y la proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y

c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado.

Párrafo 5. El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que el agente reductor no contiene un resto

cianoborhidruro.

Párrafo 6. El procedimiento de cualquier párrafo anterior en el que en el antígeno es un sacárido bacteriano.

Párrafo 7. El procedimiento de cualquier párrafo anterior en el que en el antígeno es un sacárido capsular bacteriano.

5 **Párrafo 8.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1-7, en el que el antígeno es un sacárido bacteriano originario de *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *N.meningitidis*, *S.aureus*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *Salmonella* Vi o *S.epidermidis*.

10 **Párrafo 9.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 7 u 8, en el que el antígeno es un sacárido capsular bacteriano de un serotipo de *S.pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.

Párrafo 10. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 7-9, en el que el sacárido capsular bacteriano es de un serotipo de *S.pneumoniae* seleccionado del grupo que consise en 5, 6B, 6A, 7F, 9V, 14, 19F y 23F.

Párrafo 11. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 7-10, en el que el sacárido capsular bacteriano es el sacárido capsular de *S.pneumoniae* 23F.

15 **Párrafo 12.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 7-11, en el que el sacárido capsular bacteriano es el sacárido capsular de *S.pneumoniae* 6B.

Párrafo 13. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 7-12, en el que el sacárido capsular bacteriano es el sacárido capsular de *S.pneumoniae* 6A.

20 **Párrafo 14.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 7-8, en el que el sacárido bacteriano es un polisacárido u oligosacárido de *Haemophilus influenzae* b (Hib).

Párrafo 15. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1-5, en el que el antígeno es una proteína o un fragmento de una proteína.

25 **Párrafo 16.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que la proteína vehículo es una proteína seleccionada del grupo que consiste en toxoide del tétanos (TT), fragmento C de TT, toxoide de la difteria, CRM197, neumolisina, proteína D, PhtD, PhtDE y N19.

Párrafo 17. El procedimiento del párrafo 16, en el que la proteína vehículo es CRM197.

Párrafo 18. El procedimiento del párrafo 16, en el que la proteína vehículo es el toxoide del tétanos.

Párrafo 19. El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que el antígeno se conjuga directamente con la proteína vehículo.

30 **Párrafo 20.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1-18, en el que el antígeno se conjuga con la proteína vehículo a través de un enlazador.

Párrafo 21. El procedimiento del párrafo 20, en el que el enlazador tiene una longitud entre 1 y 20 angstroms.

Párrafo 22. El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 20-21, en el que el enlazador comprende un enlazador ADH.

35 **Párrafo 23.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que las etapas b) y c) o las etapas b') y c') tienen lugar simultáneamente.

Párrafo 24. El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que la etapa c) y/o c') se llevan a cabo en presencia de DMSO.

40 **Párrafo 25.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1-23, en el que la etapa c) y/o c') se llevan a cabo en presencia de DMF.

Párrafo 26. El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que las etapas c) y/o c') tienen lugar en menos de 30 horas o en menos de 20 horas.

Párrafo 27. El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que las etapas c) y/o c') tienen lugar en un periodo de entre 15 min y 30 horas o entre 10 horas y 20 horas.

45 **Párrafo 28.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que la etapa c) y/o c') no dan como resultado la producción de iones cianuro.

- Párrafo 29.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que el antígeno y la proteína vehículo se mezclan conjuntamente antes de la etapa b) y/o antes de la etapa a').
- Párrafo 30.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que el antígeno y la proteína vehículo se liofilizan antes de la etapa b).
- 5 **Párrafo 31.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que el antígeno y la proteína vehículo se liofilizan después de la etapa a).
- Párrafo 32.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 30 o 31, en el que el antígeno y la proteína vehículo se liofilizan en presencia de un azúcar no reductor.
- 10 **Párrafo 33.** El procedimiento del párrafo 32, en el que el azúcar no reductor se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, lactosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita.
- Párrafo 34.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que se usan entre 0,5 y 3, entre 0,5 y 10 o entre 8 y 12 equivalentes molares de agentes reductores en la etapa c) y/o c').
- Párrafo 35.** El procedimiento del párrafo 34, en el que se usan entre 0,5 y 0,8 equivalentes molares de agente reductor en la etapa c) y/o c').
- 15 **Párrafo 36.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 34 o 35, en el que se usan entre 2 y 3 equivalentes molares de agente reductor en la etapa c) y/o c').
- Párrafo 37.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que la relación proteína vehículo: antígeno antes de la etapa c) y/o c') se encuentra entre 0,4:1 y 2:1 o entre 0,4/1 y 2,5/1.
- 20 **Párrafo 38.** El procedimiento del párrafo 37, en el que la relación proteína vehículo : antígeno antes de la etapa c) y/o c') se encuentra entre 1:1 y 2:1.
- Párrafo 39.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que la relación proteína vehículo: antígeno después de la etapa c) y/o c') se encuentra entre 0,8:1 y 3,5:1.
- Párrafo 40.** El procedimiento del párrafo 39, en el que la relación proteína vehículo: antígeno después de la etapa c) y/o c') se encuentra entre 1,3:1 y 2,7:1.
- 25 **Párrafo 41.** El procedimiento del párrafo 39, en el que la relación proteína vehículo: antígeno después de la etapa c) y/o c') se encuentra entre 1:1 y 1,5:1.
- Párrafo 42.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que se cubren cualesquiera grupos carbonilo sin reaccionar de los extremos con borohidruro de sodio (NaBH_4).
- 30 **Párrafo 43.** El procedimiento del párrafo 42, en el que se usan entre 1-10 equivalentes molares de borohidruro de sodio.
- Párrafo 44.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 42-43, en el que el producto de la etapa c) o c') se hace reaccionar con borohidruro de sodio durante 15 min-15 h.
- Párrafo 45.** El procedimiento del párrafo 44, en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con peryodato.
- 35 **Párrafo 46.** El procedimiento del párrafo 45 en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con 0,001-0,7 equivalentes molares de peryodato.
- Párrafo 47.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior en el que la etapa a) tiene lugar en un tampón que no contiene un grupo amino.
- 40 **Párrafo 48.** El procedimiento del párrafo 47, en el que el tampón se selecciona del grupo que consiste en tampón de fosfato, tampón de maleato, tampón de borato, tampón de acetato, tampón de carbonato y tampón de citrato.
- Párrafo 49.** El procedimiento del párrafo 48, en el que el tampón es tampón de fosfato.
- Párrafo 50.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 47-49, en el que tampón tiene una concentración entre 1-50 mM, 1-25 mM, 1-10 mM, 5-15 mM, 8-12 mM o 10-50 mM o de aproximadamente 10 mM.
- 45 **Párrafo 51.** El procedimiento de una cualquiera de cualquier párrafo anterior, en el que el pH durante la etapa a) es un pH de 3,0-8,0, pH de 5,0-7,0 o pH de 5,5-6,5 o aproximadamente un pH de 6,0.
- Párrafo 52.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que la etapa a) se lleva a cabo en la oscuridad.

- Párrafo 53.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 6-14 o 16-52, en el que el antígeno es bien un sacárido bacteriano nativo o es un sacárido bacteriano que se ha reducido en tamaño por un factor de no más de x20 (por ejemplo por microfluidización).
- Párrafo 54.** El procedimiento del párrafo 53, en el que el antígeno se microfluidiza antes de la etapa a).
- 5 **Párrafo 55.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que el peso molecular promedio del antígeno se encuentra entre 1-1100 kDa, 100-470 kDa, 200-300 kDa, 600-1100 kDa o 800-1000 kDa después de la etapa a).
- Párrafo 56.** El procedimiento del párrafo 55, en el que el peso molecular promedio del antígeno se encuentra entre 100-470 kDa o 200-300 kDa después de la etapa a).
- 10 **Párrafo 57.** El procedimiento del párrafo 55, en el que el peso molecular promedio del antígeno se encuentra entre 1 y 50 kDa o entre 5 y 10 kDa después de la etapa a).
- Párrafo 58.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior que comprende una etapa adicional e) de purificación del antígeno conjugado.
- Párrafo 59.** El procedimiento del párrafo 58, en el que la etapa e) comprende purificar el antígeno conjugado usando diafiltración.
- 15 **Párrafo 60.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 58-59, en el que la etapa e) comprende purificar el antígeno conjugado usando cromatografía de intercambio iónico.
- Párrafo 61.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 58-60, en el que la etapa e) comprende además cromatografía de permeación en gel.
- 20 **Párrafo 62.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior que comprende una etapa adicional f) en la que el antígeno conjugado se filtra de forma estéril.
- Párrafo 63.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior que contiene una etapa adicional de mezclado del antígeno conjugado con antígenos adicionales.
- Párrafo 64.** El procedimiento del párrafo 63, en el que los antígenos adicionales comprenden al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sacáridos de *S.pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.
- 25 **Párrafo 65.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-64, en el que el antígeno comprende adicionalmente los sacáridos de *S.pneumoniae* 4, 9V, 14, 18C y 19F.
- Párrafo 66.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-65, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 19A.
- 30 **Párrafo 67.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-66, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 6A.
- Párrafo 68.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-67, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 1.
- Párrafo 69.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-68, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 5.
- 35 **Párrafo 70.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-69, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 7F.
- Párrafo 71.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-70, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 3.
- 40 **Párrafo 72.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-71, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 23F.
- Párrafo 73.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-72, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 6B.
- Párrafo 74.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-73, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 6A.
- 45 **Párrafo 75.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-74, en el que el antígeno comprende adicionalmente el sacárido de *S.pneumoniae* 33F.

- Párrafo 76.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-75, en el que los antígenos adicionales comprenden una o más proteínas de *S.pneumoniae* seleccionadas del grupo que consiste en la familia tríada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia de LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncado de CbpX-truncado de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133.
- Párrafo 77.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-76, en el que los antígenos adicionales comprenden toxoide de la difteria (DT), toxoide del tétanos (TT) y *Bordetella pertussis* de célula completa inactivada (Pw) o dos o más componentes no celulares de tos ferina (Pa).
- Párrafo 78.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-77, en el que los antígenos adicionales comprenden un antígeno de superficie de la hepatitis B (HepB)
- Párrafo 79.** El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 63-78, en el que los antígenos adicionales comprenden uno o más conjugados de una proteína vehículo y un polisacárido capsular de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *N.meningitidis* tipo A (MenA), *N.meningitidis* tipo C (MenC), *N.meningitidis* tipo W (MenW) y *N.meningitidis* tipo Y (MenY).
- Párrafo 80.** El procedimiento de cualquier párrafo anterior, en el que el antígeno conjugado se mezcla con un coadyuvante.
- Párrafo 81.** El procedimiento del párrafo 80, en el que el coadyuvante es una sal de aluminio.
- Párrafo 82.** Una composición inmunógena que comprende el antígeno conjugado mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Párrafo 83.** Una composición inmunógena que puede obtenerse mediante el procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1-82.
- Párrafo 84.** Una composición inmunógena obtenida mediante el procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1-82.
- Párrafo 85.** La composición inmunógena de uno cualquiera de los párrafos 82-84, en la que el excipiente farmacéutico no comprende cloruro de sodio.
- Párrafo 86.** La composición inmunógena de uno cualquiera de los párrafos 82-85, comprendiendo la composición inmunógena tampón de maleato.
- Párrafo 87.** La composición inmunógena de uno cualquiera de los párrafos 82-86 que además comprende un coadyuvante.
- Párrafo 88.** La composición inmunógena del párrafo 87, en la que el coadyuvante es una sal de aluminio.
- Párrafo 89.** Una vacuna que comprende la composición inmunógena de los párrafos 82-88.
- Párrafo 90.** La composición inmunógena de uno cualquiera de los párrafos 82-88 o la vacuna del párrafo 89 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, por ejemplo una enfermedad bacteriana.
- Párrafo 91.** La composición inmunógena de uno cualquiera de los párrafos 82-88 o la vacuna del párrafo 89 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*, enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y enfermedad por *Salmonella*.
- Párrafo 92.** El uso de la composición inmunógena de uno cualquiera de los párrafos 82-88 o de la vacuna del párrafo 89 en la prevención o el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo una enfermedad bacteriana.
- Párrafo 93.** El uso de la composición inmunógena de uno cualquiera de los párrafos 82-88 o la vacuna del párrafo 89 en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*, enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y enfermedad por *Salmonella*.
- Párrafo 94.** El uso de la composición inmunógena de uno cualquiera de los párrafos 82-88 o de la vacuna del párrafo 89 para su uso en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo una enfermedad bacteriana.
- Párrafo 95.** El uso de la composición inmunógena de uno cualquiera de los párrafos 82-88 o la vacuna del párrafo 89 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*, enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y

enfermedad por *Salmonella*.

Párrafo 96. Un procedimiento de prevención o de tratamiento de una infección, por ejemplo una infección bacteriana, que comprende administrar la composición inmunógena de los párrafos 82-88 o la vacuna del párrafo 89 a un paciente.

- 5 **Párrafo 97.** Un procedimiento de prevención o de tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en meningitis bacteriana, enfermedad por neumococos, enfermedad por *Haemophilus influenzae*, enfermedad por meningococos, enfermedad por estafilococos, enfermedad por enterococos y enfermedad por *Salmonella* que comprende administrar la composición inmunógena de los párrafos 82-88 o la vacuna del párrafo 89 a un paciente.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Oxidación de 23F y 6B usando peryodato

15 Los polisacáridos (PS) 23F o 6B se disolvieron en KH_2PO_4 100 mM (pH de 7,4), KH_2PO_4 10 mM o WFI para formar soluciones de 2 mg de PS/ml. La solución se incubó durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. Después de este periodo de tiempo se ajustó el pH a 6,0 con HCl 1 N. Se añadió peryodato en polvo o en forma líquida (10 mg/ml en WFI) en diversas cantidades para lograr un intervalo de relaciones molares (tabla 1). Las soluciones se incubaron durante 17 horas a temperatura ambiente (20-25 °C) y después de este periodo de tiempo las muestras se dializaron o diafiltraron frente a WFI.

20 Se usó cromatografía de filtración en gel de alto rendimiento acoplada con detectores de índice de refracción y de dispersión de luz láser a múltiples ángulos (MALLS) para medir el peso molecular. Se usó el medio de exclusión por tamaño (TSK5000PWXL-Tosoh) para obtener el perfil de la distribución de tamaño molecular del polisacárido (elución 0,5 ml/min en NaCl 0,2 M-Na₃N al 0,02 %).

25 La tabla 1 y la figura 1 describen los resultados de estos experimentos. La tabla 1 se refiere a muestras etiquetadas 23F y 23FATCC. Las muestras etiquetadas 23F eran muestras 23F producidas en GSK, mientras que las muestras etiquetadas 23FATCC se obtuvieron usando una línea celular obtenida de ATCC (Colección Estadounidense de Cultivos Tipo). Estos resultados demuestran que para el sacárido 23F tiene lugar un cambio de tamaño sustancial en la oxidación usando una alta cantidad de equivalentes molares de peryodato en tampón de fosfato 100 mM. Este efecto de cambio de tamaño puede reducirse reduciendo la concentración de tampón de fosfato o los equivalentes molares de peryodato usados.

Tabla 1

23F				6B			
Muestra	Equivalente molar de peryodato	Tampón	Tamaño (kDa)	Muestra	Equivalente molar de peryodato	Tampón	Tamaño (kDa)
23F	0	agua	861	6B	0	fosfato 10 mM	1022
23F	0	fosfato 10 mM	847	6B	0,1	fosfato 10 mM	975
23F	0	fosfato 100 mM	860	6B	0,2	fosfato 10 mM	990
23FATCC	0	fosfato 100 mM	1655	6B	0,3	fosfato 10 mM	961
23F	1	fosfato 100 mM	<1	6B	0,75	fosfato 10 mM	868
23F	1	agua	36				
23F	1,2	fosfato 100 mM	<1				
23FATCC	1	fosfato 100 mM	2				
23FATCC	0,125	fosfato 100 mM	39				
23F	0,1	fosfato 100 mM	466,9				
23F	0,15	fosfato 10 mM	398,5				
23F	0,2	fosfato 10 mM	336				
23F	0,5	fosfato 10 mM	179,1				

Ejemplo 2: Conjugación de 23F a CRM197 usando aminación reductora y química de CDAP (ejemplo de referencia)**Aminación reductora**

- 5 Se disolvió 1 g de PS23F en 500 ml de KH_2PO_4 10 mM, pH de 7,15. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante dos horas. El pH se ajustó a 6,0 con HCl 1 M. Se añadieron 111 mg de peryodato (NaIO_4 , 0,4 equivalentes molares de peryodato) a la solución de PS23F y la solución se incubó durante 17 horas en la oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el PS23F. Después, la solución de diafiltró frente a WFI (corte de 100 kDa).
- 10 El PS23F se liofilizó con la proteína CRM197 (a una relación CRM/PS (p/p): 0,625) en presencia de un agente estabilizante.
- 15 Se solubilizaron 900 mg de la mezcla PS23F/CRM197 liofilizada mediante la adición de 350 ml de disolvente DMSO y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Para reducir la mezcla PS23F/CRM197 se añadió 1 equivalente molar de NaBH_3CN (735 μl de una solución de 100 mg/ml en WFI). La solución se incubó durante 40 horas adicionales a temperatura ambiente (15 °C-25 °C) con agitación. Después de este periodo de tiempo se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/ml en WFI) y la solución se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadieron 2200 ml de NaCl 150 mM antes de la diafiltración (corte de 100 kDa) y la purificación por DEAE. Las fracciones de interés se reunieron y se filtraron a través de un filtro de 0,22 μm .

CDAP

- 20 Se disolvieron 200 mg de PS23F micorfluidizado en WFI hasta que se obtuvo una concentración de 10 mg/ml. Se añadió NaCl a esta solución a una concentración final 2 M.
- Se añadió suficiente solución de CDAP (100 mg/ml recién preparados en 5/50 v/v de acetonitrilo/WFI) como para lograr una relación CDAP/PS de 0,75/1 (p/p)
- 25 Después de 90 segundos, el pH se elevó a pH de 9,5 mediante la adición de NaOH 0,1 N. 3 minutos después se añadió suficiente CRM197 (10 mg/ml en NaCl 0,15 M) como para lograr una relación de 1,5 (CRM197:PS (p/p)); el pH se mantuvo a pH de 9,5. La solución se incubó durante 1 hora a pH de 9,5.
- 30 Después de esta etapa de acoplamiento, se añadieron 10 ml de solución de glicina 2 M a la mezcla y el pH se ajustó a pH de 9,0 (el pH de inactivación). La solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El conjugado se purificó usando un filtro de 5 μm seguido por Sephacryl S400HR que retira moléculas pequeñas y polisacáridos y proteínas sin conjugar. La elución se logró usando NaCl 150 mM. Las fracciones de interés se reunieron y se filtraron con una membrana de 0,22 μm . El conjugado resultante tenía una relación CRM197/PS final (p/p) de 1,35/1.

Ejemplo 3: Inmunogenicidad de conjugados 23F-CRM197 preparados mediante aminación reductora y química de CDAP (ejemplo de referencia)

- 35 Los conjugados se prepararon usando los procedimientos descritos en el ejemplo 2. Se inmunizaron por vía intramuscular cobayas hembra tres veces (los días 0, 14 y 28) con 0,25 μg de los conjugados PS23F-CRM197. Se extrajo sangre de los animales el día 42 y se midió la respuesta de anticuerpos dirigida contra PS23F por ELISA y OPA.

ELISA

- 40 Las microplacas se recubrieron con polisacárido de neumococos purificado en tampón PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % y Tween 20 al 0,05 %. Se incubaron sueros durante 1 hora a 37 °C con CPS (V/V) en PBS con el 0,05 % de Tween 20. Los sueros se añadieron a los micropocillos y se diluyeron de forma seriada (etapa de dilución de dos veces) en PBS- 0,05 % de Tween. Las placas se incubaron con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como anteriormente y se añadió un conjugado de anticuerpos IgG anti-cobaya-peroxidasa, después las placas se incubaron durante 30 minutos a TA. Después de lavar, el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 M, pH de 4,5, y 5 μl de H_2O_2) se añadió a cada pocillo
- 45 durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N. Se leyó la absorbancia a 490-620 nm usando un espectrofotómetro. El desarrollo de color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero. El nivel de IgG anti-PS presente en los sueros se determinó mediante comparación con la curva de referencia del suero añadido a cada placa y se expresó en $\mu\text{g/ml}$. Los resultados se analizaron estadísticamente después de asumir la homogeneidad de la varianza (comprobada mediante el ensayo C de Cochran) y la normalidad (comprobada usando el ensayo de Shapiro-Wilk). Todas las estadísticas se llevaron a cabo usando Anova (Tukey-HSD) sobre la transformación logarítmica de la concentración de IgG.
- 50

Opsonofagocitosis

Las muestras de suero se calentaron durante 45 min a 56 °C para inactivar cualquier complemento endógeno

remanente. Se diluyeron de forma seriada partes alícuotas de veinticinco microlitros de muestras de suero diluidas 1:2 (dos veces) en 25 μ l de tampón OPA (HBSS-14,4 % de PBS inactivado) por pocillo de una placa de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos. Subsiguientemente, se añadieron 25 μ l de una mezcla de células HL-60 activadas (1×10^7 células/ml), semillas de trabajo de neumococos recién descongeladas y complemento de conejo bebé recién descongelado en una relación 4/2/1 (v/v/v) a los sueros diluidos para proporcionar un volumen final de 50 μ l. La placa de ensayo se incubó durante 2 h a 37 °C con agitación orbital (210 rpm) para promover el proceso fagocítico. La reacción se detuvo disponiendo la microplaca sobre hielo durante al menos 1 min. Después se transfirió una parte alícuota de 20 μ l de cada pocillo de la placa al pocillo correspondiente de una microplaca de fondo redondo de 96 pocillos y se añadieron 50 μ l de caldo de Todd-Hewitt -0,9 % de agar a cada pocillo. Después de incubación durante la noche a 37 °C y el 5 % de CO₂, las colonias de neumococos que aparecieron en el agar se contaron usando un sistema de análisis de imágenes automatizado (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se usaron ocho pocillos sin suero como controles bacterianos para determinar el número de neumococos por pocillo. El número medio de UFC de los pocillos de control se determinó y se usó para calcular la actividad de destrucción para cada muestra de suero. La valoración de OPA para las muestras de suero se determinó mediante dilución recíproca de suero capaz de facilitar el 50 % de destrucción de los neumococos. Las valoraciones opsonofagocíticas se calcularon usando un análisis de ajuste de curva de 4 parámetros.

Los resultados se analizaron estadísticamente después de asumir la homogeneidad de la varianza (comprobada mediante el ensayo C de Cochran) y la normalidad (comprobada usando el ensayo de Shapiro-Wilk). Todas las estadísticas se realizaron por Anova (Tukey-HSD) sobre la transformación logarítmica de concentración de IgG por ELISA y Kruskal-Wallis sobre el logaritmo de dilución para OPA.

Se indujo una respuesta de anticuerpos significativamente superior en las cobayas después de inmunización con PS23F-CRM197 conjugados mediante aminación reductora que con PS23F-CRM197 conjugados mediante química CDAP, como se observa en la figura 2.

Tabla 2

Ensayo	23-CRM197 preparado por afinación reductora	23F-CRM197 preparado por CDAP
Valoración ELISA (μ g/ml)	213,3	40,5
OPA (50 % de destrucción)	9232	591

Ejemplo 4: Otro ejemplo de la aminación reductora de 23F

23 F-C RM-RA-116

Se disolvieron 150 mg de PS23F nativo (PS23FP114) a una concentración de 2 mg/ml en tampón de fosfato 10 mM (pH de 7,2) durante 4 horas. Después de la disolución, el pH se ajustó a un pH de 6,0 con HCl 1 N. Después se añadieron 0,4 equivalentes molares de peryodato (NaIO₄) a la solución de PS y se incubó durante 17 h en la oscuridad a 25 °C. Después, la solución se diafiltró (corte 30 kDa) frente a WFI y el PS oxidado se filtró con una membrana de 0,22 μ m.

Se liofilizaron conjuntamente 50 mg de PS oxidado y 75 mg de CRM197 (relación CRM/PS (p/p): 1,5/1) con un agente estabilizante. Se solubilizaron PS + CRM197 liofilizados con 20 ml de DMSO durante 2 h a temperatura ambiente (15-25 °C). Después se añadió 1 equivalente molar de triacetoxiborohidruro de sodio (13,7 mg) y después de 17 h con agitación se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH₄ (100 mg/ml en NaOH 0,1 M), operación seguida por una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se diluyó 5x mediante la adición de WFI, operación seguida por una diafiltración (corte 30 kDa) frente a tampón de fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH de 7,2. Después se cargó el conjugado en resina DEAE y se eluyó en tampón de fosfato 10 mM, NaCl 500 mM, pH de 7,2. El conjugado se filtró finalmente en 0,22 μ m. El conjugado resultante tenía una relación CRM/PS final (p/p) de 2,3/1.

Para otros conjugados, se añadió una segunda etapa de diafiltración después de la columna de DEAE para cambiar el tampón (NaCl 150 mM como tampón final).

Ejemplo 5: Conjugación de 6B con CRM197 usando aminación reductora (con diferentes relaciones de proteína:sacárido y diferentes sacáridos 6B microfluidizados de tamaños modificados) y química de CDAP

6B-CRM-RA-122

Se diluyeron 200 mg de PS6B microfluidizado (84 kDa, 11,7 mg/ml) a 2 mg/ml en tampón de fosfato 10 mM (pH de 7,2). El pH se ajustó a un pH de 6,0 con HCl 1 N. Después se añadieron 0,1 equivalentes molares de peryodato (NaIO₄) a la solución de PS y se incubó durante 17 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Después, la solución

de diafiltró (corte de 30 kDa) frente a WFI. Se liofilizaron conjuntamente 50 mg de PS y 30 mg de CRM197 (relación CRM/PS (p/p): 0,6/1) con un agente estabilizante. Se solubilizaron PS + CRM197 liofilizados con 20 ml de DMSO durante 3 h a temperatura ambiente. Después se añadieron 2,5 equivalentes molares de triacetoxiborohidruro de sodio (38,7 mg) y después de 16 h de agitación se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH₄ (100 mg/ml en NaOH 0,1 M), operación seguida por una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se diluyó 4x mediante la adición de WFI seguida por diafiltración (corte 100 kDa). El conjugado se filtró después en 0,22 µm. El conjugado resultante tenía una relación CRM/PS final (p/p) de 1,1/1.

6B-CRM-RA-123

Se conjugó PS6B microfluidizado (84 kDa) con CRM197 tal como se ha descrito para 6B-CRM-RA-122 excepto en que la etapa de liofilización se llevó a cabo usando una relación CRM197/PS inicial (p/p) de 2/1 y se usaron 33 ml de DMSO para la disolución en la etapa de DMSO (en lugar de 20 ml). El conjugado resultante tenía una relación CRM/PS final (p/p) de 3,0/1.

6B-CRM-RA-124

Se diluyeron 200 mg de PS6B microfluidizado (350 kDa) a 2 mg/ml en tampón de fosfato 10 mM (pH de 7,2). El pH se ajustó a un pH de 6,0 con HCl 1 N. Después se añadieron 0,1 equivalentes molares de peryodato (NaIO₄) a la solución de PS y se incubó durante 17 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Después, la solución de diafiltró (corte de 100 kDa) frente a WFI. Se liofilizaron conjuntamente 50 mg de PS y 60 mg de CRM197 (relación CRM/PS (p/p): 1,2/1) con un agente estabilizante. Se solubilizaron PS + CRM197 liofilizados con 20 ml de DMSO durante 5 h a temperatura ambiente. Después se añadieron 2,5 equivalentes molares de triacetoxiborohidruro de sodio (38,7 mg) y después de 16 h de agitación se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH₄ (100 mg/ml en NaOH 0,1 M), operación seguida por una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se diluyó 4x mediante la adición de WFI seguida por diafiltración (corte 100 kDa). El conjugado se filtró después en 0,22 µm. El conjugado resultante tenía una relación CRM/PS final (p/p) de 1,6/1.

6B-CRM-RA-125

Se conjugó PS6B microfluidizado (350 kDa) con CRM197 tal como se ha descrito para 6B-CRM-RA-124 excepto en que la etapa de liofilización se llevó a cabo usando una relación CRM197/PS inicial (p/p) de 2/1 y la disolución en DMSO se llevó a cabo usando 33 ml (en lugar de 20 ml). El conjugado resultante tenía una relación CRM/PS final (p/p) de 2,9/1.

6B-CRM-003:

Se diluyeron 50 mg de PS6B microfluidizado a 10 mg/ml en WFI. Se añadió NaCl en forma sólida para lograr una concentración final 2 M. Se añadió solución de CDAP (100 mg/ml recién preparados en 50/50 v/v de acetonitrilo/WFI) para lograr la relación CDAP/PS apropiada (1,5 mg/mg de PS). Después de 1,5 minutos, se elevó el pH al pH de activación de 9,5 mediante la adición de NaOH 0,1 N y se estabilizó a este pH hasta la adición de CRM197. Después de 3 minutos se añadió CRM197 (10 mg/ml en NaCl 0,15 M) para lograr una relación CRM197/PS (p/p) de 2; el pH se mantuvo en el pH de acoplamiento de 9,5. La solución se dejó en reposo durante 2 h con regulación del pH.

Después de la etapa de acoplamiento, se añadieron 2,5 ml de solución de glicina 2 M a la mezcla. El pH se ajustó al pH de inactivación (pH de 9,0). La solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, el conjugado se filtró usando un filtro de 5 µm y se inyectó a una columna Sephacryl S400HR. La elución se llevó a cabo en NaCl 150 mM. Las fracciones de interés se reunieron y se filtraron con una membrana de 0,22 µm. El conjugado resultante tenía una relación CRM197/PS final (p/p) de 1,5/1.

6B-CRM-RA-144

Se diluyó 1 g de PS6B microfluidizado (245 kDa) a 2 mg/ml en tampón de fosfato 10 mM (pH de 7,2). Después el pH se ajustó a un pH de 6,0 con HCl 1 N. Después se añadieron 0,1 equivalentes molares de peryodato (NaIO₄) a la solución de PS y se incubó durante 18 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Después, la solución de diafiltró frente a WFI (corte de 100 kDa). Se liofilizaron conjuntamente 200 mg de PS oxidado y 240 mg de CRM197 (relación CRM/PS (p/p): 1,2/1) con un agente estabilizante. Se solubilizaron PS + CRM197 liofilizados con 80 ml de DMSO durante 6 h a 25 °C. Después se añadieron 2,5 equivalentes molares de triacetoxiborohidruro de sodio (154,9 mg) y después de 16 h de agitación a 25 °C se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH₄ (100 mg/ml en NaOH 0,1 M) y se incubó durante 30 minutos. La solución se diluyó 5x en WFI y después de 30 min se diafiltró 10x con NaCl 150 mM y después 5x con PO₄ (K/K₂) 10mM, pH de 7,2/NaCl 150 mM (corte de 100 kDa). Después, el retentado se cargó a una columna DEAE. La columna se lavó con tampón de PO₄(K/K₂) 10 mM, pH de 7,2 /NaCl 150 mM. El conjugado se eluyó con tampón de PO₄(K/K₂) 10 mM, pH de 7,2 /NaCl 150 mM. El eluato se concentró y se diafiltró con 5 volúmenes de NaCl 150 mM y después se filtró con un filtro de 0,22 µm. El conjugado resultante tenía una relación CRM/PS final (p/p) de 1,6/1.

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de conjugados 6B-CRM197 preparados mediante aminación reductora y química de CDAP

Se inmunizaron grupos de 40 ratones Balb/c hembra (4 semanas de edad) por vía intramuscular tres veces, los días 0, 14 y 28, con 0,1 µg de conjugados de PS6B producidos mediante aminación reductora o química de CDAP formulados en AlPO₄. Se usó PS6BPD como referencia. Se extrajo sangre de los ratones el día 42 y se midió la respuesta de anticuerpos dirigida contra cada antígeno mediante ELISA y OPA.

Se inmunizaron grupos de 20 cobayas hembra (150 g de Hartley) por vía intramuscular tres veces, los días 0, 14 y 28, con 0,25 µg de conjugados de PS6B producidos mediante aminación reductora o química de CDAP coadyuvados con AlPO₄. Se usó PS6B-PD como referencia. Se extrajo sangre de las cobayas el día 42 y se midió la respuesta de anticuerpos dirigida contra cada antígeno mediante ELISA y OPA.

OPA de ratón y cobaya

Las muestras de suero se calentaron durante 45 min a 56 °C para inactivar cualquier complemento endógeno remanente. Se diluyeron 1:2 de forma seriada partes alícuotas de veinticinco microlitros de muestras de suero diluidas dos veces en 25 µl de tampón OPA (HBSS-14,4 % de FBS inactivado) por pocillo de una placa de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos. Subsiguientemente, se añadieron 25 µl de una mezcla de células HL-60 activadas (1 3 10⁷ células/ml), semillas de trabajo de neumococos recién descongeladas y complemento de conejo bebé recién descongelado en una relación 4/2/1 (v/v/v) a los sueros diluidos para proporcionar un volumen final de 50 µl. La placa de ensayo se incubó durante 2 h a 37 °C con agitación orbital (210 rpm) para promover el proceso fagocítico. La reacción se detuvo disponiendo la microplaca sobre hielo durante al menos 1 min. Después se transfirió una parte alícuota de 20 µl de cada pocillo de la placa al pocillo correspondiente de una microplaca de fondo redondo de 96 pocillos y se añadieron 50 µl de caldo de Todd-Hewitt -0,9 % de agar a cada pocillo. Después de incubación durante la noche a 37 °C y el 5 % de CO₂, las colonias de neumococos que aparecieron en el agar se contaron usando un sistema de análisis de imágenes automatizado (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se usaron ocho pocillos sin suero como controles bacterianos para determinar el número de neumococos por pocillo. El número medio de UFC de los pocillos de control se determinó y se usó para calcular la actividad de destrucción para cada muestra de suero. La valoración de OPA para las muestras de suero se determinó mediante dilución recíproca de suero capaz de facilitar el 50 % de destrucción de los neumococos. Las valoraciones opsonofagocíticas se calcularon usando un análisis de ajuste de curva de 4 parámetros.

La tabla 3 describe los niveles de GMC obtenidos mediante inmunización de ratones balb/c con los conjugados preparados usando los procedimientos del ejemplo 4.

	G1	G2	G3
Sujeto/resultado	PS06B-CMR122 (R1/1, PS 84)	PS06B-CMR123 (R:3/1, PS 84 kDa)	PS06B-CMR124 (R:1,5 PS 350 kDa)
GMC (UG-ML)	0,83	0,37	1,18
Respondedores (%)	31/40	26/40	33/40

	G4	G5	G6
Sujeto/resultado	PS06B-CMR125 (R:2,9/1, PS 350 kDa)	PS06B-CRM003 (CDAP)	PS06B-PD
GMC (UG-ML)	0,64	0,31	0,10
Respondedores (%)	29/40	29/40	15/40

Tabla 3

La inmunogenicidad de estos conjugados en ratones balb/c se describe en la figura 3. Conjuntamente, la figura 3 y la tabla 3 demuestra que en el modelo de ratón los conjugados producidos por aminación reductora fueron comparables con los producidos usando química de CDAP. En particular, la figura 3 demuestra que las inmunogenicidades de los conjugados producidos usando aminación reductora fueron superiores a la inmunogenicidad del conjugado usando química de CDAP.

La tabla 4 describe los niveles de GMC obtenidos mediante inmunización de cobayas con los conjugados preparados usando los procedimientos del ejemplo 4.

	G1	G2	G3
Sujeto/resultado	PS06B-CMR122 (R1/1, PS 84 kDa)	PS06B-CMR123 (R:3/1, PS 84 kDa)	PS06B-CMR124 (R:1,5/1 PS 350 kDa)
GMC (UG-ML)	3,51	7,70	2,84
Respondedores (%)	20/20	20/20	20/20

	G4	G5	G6
Sujeto/resultado	PS06B-CMR125 (R:2,9/1, PS 350 kDa)	PS06B-CRM003 (CDAP)	PS06B-PD
GMC (UG-ML)	19,93	3,70	1,55
Respondedores (%)	20/20	20/20	20/20

Tabla 4

La inmunogenicidad de estos conjugados en cobayas se describe en la figura 4. De forma similar a los experimentos llevados a cabo en el modelo de ratón, los resultados expuestos en la tabla 4 y en la figura 4 muestran que los conjugados producidos mediante aminación reductora fueron comparables a los producidos usando química de CDAP, en particular PS06B-CRM125 mostró unos niveles de GMC e inmunogenicidades significativamente superiores al conjugado producido usando CDAP.

Ejemplo 7 Conjugación de Hib con toxoide del tétanos usando aminación reductora

Hib-IO4-LS080

Se disolvieron 2,9 g de PS (dosis de orcinol, lote AHIBCPA007) en 260 ml de tampón de fosfato 10 mM (Na/K₂), pH de 6,2, durante 4 h y 30 min a temperatura ambiente y después durante la noche a +4 °C. Después de 4 horas de disolución, se diluyó PS a 10 mg/ml con tampón de fosfato y después se oxidó en la oscuridad con 0,07 equivalentes molares de NaIO₄ durante 60 minutos. El PS oxidado se diafiltró (corte 2 kDa) frente a 3,5 volúmenes de tampón de fosfato y después se diafiltró en un filtro de 0,22 µm.

El número de unidades repetidas obtenido después de oxidación se estimó mediante MRN de ¹H y se encontró que era de 21.

Hib-TT-LS210, 212 y 213

Se mezclaron 200 mg de PS oxidado (14,56 mg/ml) con 300 mg de TT (31,18 mg/ml, relación TT/PS (p/p): 1,5/1) y se diluyeron a 4 mg/ml con 36,64 ml de tampón de fosfato 10 mM (Na/K₂), pH de 6,2. La solución se liofilizó con un agente estabilizante. Se solubilizó PS + TT liofilizado con 20 ml de DMSO durante 6 h a 25 °C. Después se añadieron 10 equivalentes molares de triacetoxiborohidruro de sodio (38,7 mg) y después de 16 h con agitación se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH₄ (100 mg/ml en NaOH 0,1 M), operación seguida por una incubación de 30 min a temperatura ambiente. La solución se diluyó 3x mediante la adición de WFI, operación seguida por una etapa de diafiltración (5 volúmenes de WFI seguidos por 5 volúmenes de tampón de acetato 10 mM, NaCl 150 mM, pH de 6,2, MWCO de 100 kDa). La muestra se cargó después en resina Sephacryl S300HR. La elución se llevó a cabo en tampón de acetato 10 mM usando NaCl 150 mM (pH de 6,2). Las fracciones de interés se reunieron y se filtraron con una membrana de 0,22 µm. Los conjugados resultantes tenían una relación TT/PS final (p/p) de 2,1/1.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de conjugación de un antígeno que comprende las etapas de:

- a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- b) hacer reaccionar el antígeno activado y una proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y
- c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado; o
- a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- b') hacer reaccionar el antígeno activado y un enlazador para formar un grupo imina que une el antígeno activado al enlazador;
- c') reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno-enlazador y
- d) hacer reaccionar un antígeno-enlazador con una proteína vehículo para formar un antígeno conjugado;

en el que el antígeno se origina a partir de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Vi o *Staphylococcus epidermidis*, en el que el antígeno es un sacárido capsular bacteriano y en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con peryodato.

2. Un procedimiento de conjugación de un antígeno que comprende las etapas de:

- a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- a') liofilizar el antígeno activado y una proteína vehículo, operación seguida por reconstitución en DMSO o DMF;
- b) hacer reaccionar el antígeno activado y la proteína vehículo para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo; y
- c) reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno conjugado; o
- a) activar el antígeno para formar un antígeno activado;
- a') liofilizar el antígeno activado y un enlazador, operación seguida por reconstitución en DMSO o DMF;
- b') hacer reaccionar el antígeno activado y el enlazador para formar un grupo imina que une el antígeno activado a la proteína vehículo y
- c') reducir el grupo imina usando un agente reductor que comprende un resto triacetoxiborohidruro para formar un antígeno-enlazador;
- d) hacer reaccionar el antígeno-enlazador con una proteína vehículo para formar un antígeno conjugado, en el que el antígeno es un sacárido capsular bacteriano y en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con peryodato.

3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente reductor no contiene un resto cianoborohidruro.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el antígeno es un sacárido bacteriano que se origina a partir de *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *N.meningitidis*, *S.aureus*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *Salmonella* Vi o *S.epidermidis*.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el antígeno es un sacárido capsular bacteriano de un serotipo de *S.pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el sacárido bacteriano es el sacárido capsular de *S.pneumoniae* 23F.

7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el sacárido bacteriano es el sacárido capsular de *S.pneumoniae* 6B.

8. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que el sacárido bacteriano es un polisacárido u oligosacárido de *Haemophilus influenzae* b (Hib).

9. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la proteína vehículo es una proteína seleccionada del grupo que consiste en toxoide del tétanos (TT), fragmento C de TT, toxoide de la difteria, CRM197, neumolisina, proteína D, PhtD, PhtDE y N19.

10. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el antígeno y la proteína vehículo se liofilizan después de la etapa a).

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el antígeno y la proteína vehículo se liofilizan en presencia de

un azúcar no reductor.

12. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el antígeno con 0,0001-0,7 equivalentes molares de peryodato.

5 **13.** El procedimiento de cualquier reivindicación anterior que comprende una etapa adicional e) de purificar el antígeno conjugado y/o que comprende una etapa adicional f) en el que el antígeno conjugado se filtra de forma estéril y/o una etapa adicional de mezclado del antígeno conjugado con antígenos adicionales.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que los antígenos adicionales comprenden al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sacáridos de *S.pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.

10 **15.** El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el antígeno conjugado se mezcla con un coadyuvante opcionalmente, en el que el coadyuvante es una sal de aluminio.

15

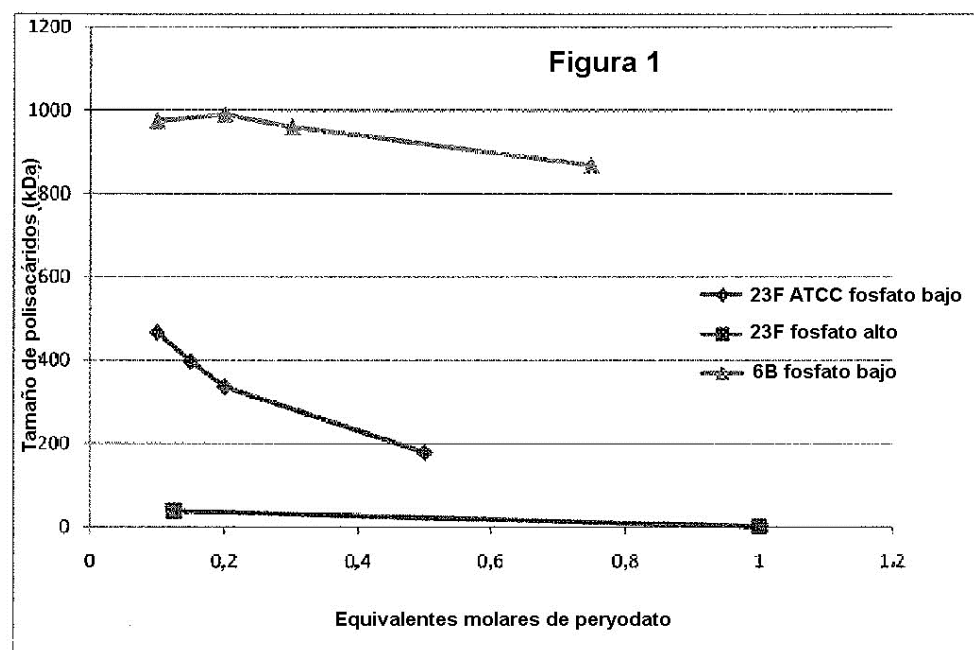
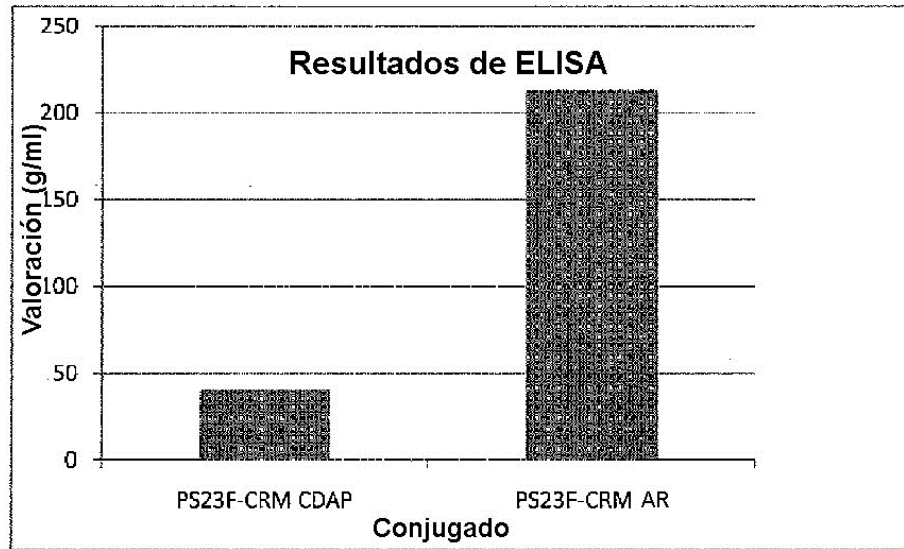


Figura 2

a)



b)

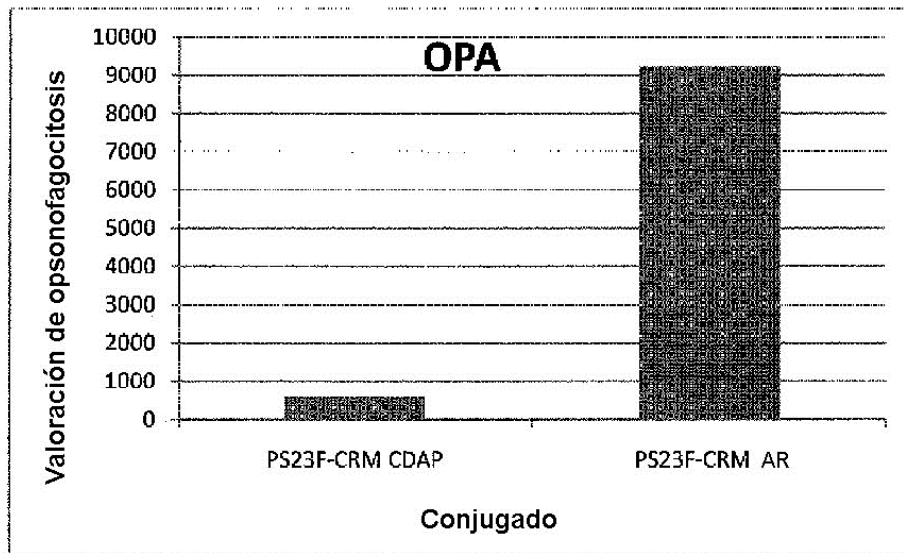


Figura 3

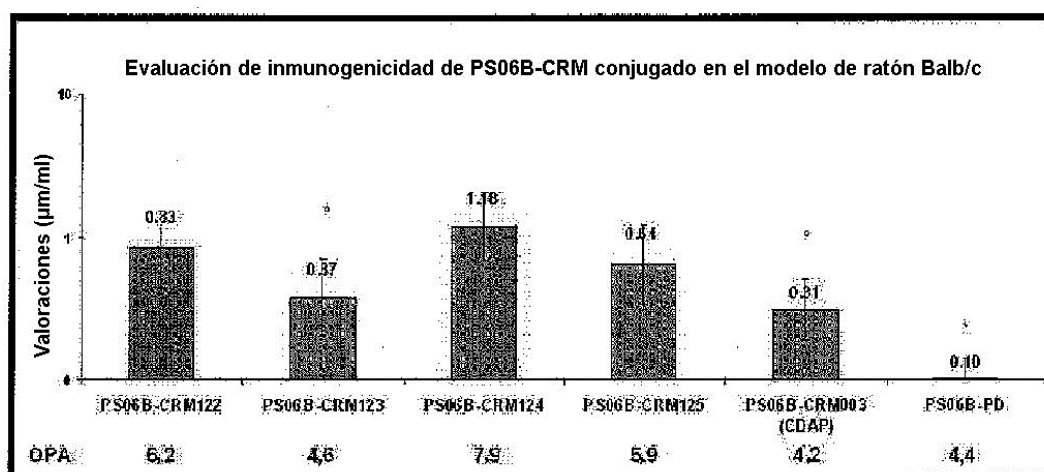


Figura 4

