(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 586 308**

(51) Int. CI.:

B01D 15/36 (2006.01)
B01D 61/14 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01)
B01D 15/34 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2009 E 09764294 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2349520**

(54) Título: **Procedimiento de purificación de un hidrato de carbono de Streptococcus del grupo A**

(30) Prioridad:

27.10.2008 US 108763 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2016

(73) Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart , BE

(72) Inventor/es:

COSTANTINO, PAOLO;
BERTI, FRANCESCO;
KABANOVA, ANNA y
ROMANO, MARIA, ROSARIA

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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 purificación de un hidrato de carbono de *Streptococcus* del grupo A

Campo técnico

La presente invención está en el campo de la purificación de polisacáridos bacterianos, particularmente los de *Streptococcus pyogenes* y particularmente para su uso en la preparación de vacunas.

Antecedentes de la técnica

Los polisacáridos de bacterias se han utilizado durante muchos años en las vacunas. Sin embargo, como los sacáridos son antígenos T-independientes, son poco inmunogénicos. La conjugación con un vehículo puede convertir los antígenos T-independientes en antígenos T-dependientes, mejorando de este modo las respuestas de memoria y permitiendo que se desarrolle la inmunidad protectora. Por tanto, las vacunas de sacáridos más eficaces se basan en glicoconjugados y el prototipo de vacuna conjugada era la de *Haemophilus influenzae* tipo b ('Hib') [por ej. véase el capítulo 14 de la referencia 95].

Otra bacteria para la que se han descrito vacunas conjugadas es *Streptococcus pyogenes*, también conocida como 'estreptococo del grupo A', o simplemente 'GAS' (acrónimo ingles de *group A Streptococcus*). Las vacunas conjugadas comprenden el hidrato de carbono GAS, que es un componente de la pared celular bacteriana. Gran parte de este trabajo ha sido realizado por John Zabriskie y colaboradores y se ha debatido en documentos tales como en las referencias 1, 2 y 3.

El punto de partida para las vacunas basadas en sacáridos es el propio sacárido y este generalmente se purifica a partir de la bacteria diana. El procedimiento de Zabriskie para la purificación del hidrato de carbono GAS se basa en los procedimientos de las referencias 4 y 5 y se describe en detalle en la referencia 6. Otro procedimiento utilizado por Zabriskie se basa en el procedimiento similar de referencia 7, como se describe en la referencia 8 y 9. Otro procedimiento se describe en la referencia 10. Estos procedimientos implican la extracción de un hidrato de carbono GAS por tratamiento ácido reductor. Específicamente, las células de *Streptococcus pyogenes* se combinan con nitrito de sodio y ácido acético glacial a fin de lisar las células y de ese modo liberar el hidrato de carbono GAS. La suspensión de lisado celular resultante se purifica a continuación por cromatografía por exclusión de tamaño (como en la referencia 10), por ejemplo mediante filtración en gel utilizando solución salina tamponada con fosfato como eluyente (como en la referencia 6) o bien aclarado por filtración de flujo tangencial (como en la referencia 8), antes de la conjugación del hidrato de carbono GAS con una proteína vehículo adecuada.

Las referencias 6 y 8 a 10 no indican el rendimiento de hidrato de carbono GAS que se consigue mediante los procedimientos de purificación utilizados. Además, aunque las referencias 6 y 8 establecen que las preparaciones de hidrato de carbono GAS resultantes "contienen menos de 1 % (p/p) de proteínas y ácidos nucleicos" [6] o están "libres de proteínas y ácidos nucleicos" [8], no hay ninguna sugerencia para eliminar impurezas distintas a las proteínas o ácidos nucleicos. Por tanto, existe una necesidad de más y mejores procedimientos para la purificación de hidrato de carbono GAS y en particular de procedimientos que logren mayores rendimientos y purezas.

Divulgación de la invención

La invención se basa en un procedimiento de purificación en el que el sacárido se somete a cromatografía de intercambio aniónico. Los inventores han encontrado que la cromatografía de intercambio aniónico proporciona un buen rendimiento de hidrato de carbono GAS. Por otra parte, la cromatografía de intercambio aniónico proporciona una preparación de hidrato de carbono GAS particularmente pura. En particular, los inventores han descubierto que el hidrato de carbono GAS a menudo está contaminada con ácido hialurónico, que se deriva del polisacárido capsular GAS. La cromatografía de intercambio aniónico es particularmente eficaz para reducir la contaminación de ácido hialurónico de hidrato de carbono GAS. Esto es particularmente ventajoso cuando el hidrato de carbono GAS está destinado para su uso en una vacuna ya que el ácido hialurónico es conocido por ser en sí mismo inmunogénico [11]. En consecuencia, la presencia de ácido hialurónico puede interferir con la respuesta inmunitaria al hidrato de carbono GAS. Por otra parte, se cree que el ácido hialurónico induce anticuerpos que son de reacción cruzada con el tejido humano ([12] y [13]), por lo que su presencia en los productos farmacéuticos puede ser perjudicial para la salud. La cromatografía de intercambio aniónico también es particularmente eficaz en la reducción de la contaminación por proteínas y ácido nucleico del hidrato de carbono GAS.

Como una ventaja adicional, los inventores han encontrado que la purificación de hidrato de carbono GAS puede llevarse a cabo en condiciones que permiten el "flujo continuo" del sacárido durante la cromatografía de intercambio aniónico, en el que las impurezas se unen a la matriz de intercambio aniónico, mientras que el hidrato de carbono GAS fluye directamente a través del sistema en el eluyente. El uso de estas condiciones simplifica el procedimiento de purificación, ya que no hay necesidad de usar un tampón de fase móvil de fuerza iónica creciente ni aumentar el pH etc. para eluir el hidrato de carbono GAS de la matriz.

Los inventores también han descubierto que el hidrato de carbono GAS a menudo está contaminado con una variante polirramnosil del hidrato de carbono GAS. El procedimiento de purificación de la presente invención es

particularmente eficaz en la reducción de la contaminación con poli-ramnosa del hidrato de carbono GAS.

La invención proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende las etapas de mezclar un hidrato de carbono GAS de *Streptococcus pyogenes* con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el hidrato de carbono GAS se purifica en un procedimiento que comprende una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. El hidrato de carbono GAS de *Streptococcus pyogenes* puede estar comprendido dentro de una suspensión que comprende al menos uno de ácido hialurónico, proteínas de estreptococos y ácidos nucleicos. En particular, la invención implica un procedimiento para la separación de hidrato de carbono GAS a partir de ácido hialurónico, que comprende una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. El ácido hialurónico generalmente se deriva del polisacárido capsular de *Streptococcus pyogenes*. Otras etapas de purificación pueden ser incluidas en el procedimiento, ya sea antes o después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Por ejemplo, la etapa(o etapas) de filtración puede incluirse para eliminar los contaminantes de alto peso molecular (tales como los residuos celulares). Del mismo modo, se puede incluir la etapa(o etapas) de ultrafiltración, en particular, después de dicha etapa(o etapas) de filtración, para eliminar contaminantes de bajo peso molecular (tales como fragmentos de polisacáridos de *Streptococcus pyogenes*). La etapa(o etapas) de filtración de gel también puede ser incluida para seleccionar moléculas de hidrato de carbono GAS de una longitud particular y para reducir la contaminación, en particular por las proteínas. Además de, o en lugar de, la etapa(o etapas) de filtración en gel, el procedimiento de la invención puede implicar una o más etapas de concentración del hidrato de carbono GAS. La etapa (o etapas) de filtración y/o ultrafiltración generalmente se lleva a cabo antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, mientras que la etapa(o etapas) de filtración en gel y/o la etapa(o etapas) de concentración normalmente se llevarán a cabo después de dicha etapa. El sacárido hidrato de carbono GAS se puede procesar para la preparación de vacunas posterior. Por lo tanto, en el procedimiento pueden incluirse diversas etapas de procesamiento, tales como etapas de diálisis y/o liofilización. El procedimiento también puede incluir una etapa de conjugar el hidrato de carbono GAS purificado con una molécula vehículo. Generalmente, la etapa de conjugación se lleva a cabo después de la etapa(o etapas) de purificación anterior.

Por consiguiente, la invención implica, en un procedimiento para la purificación del hidrato de carbono GAS de *Streptococcus pyogenes*, una mejora que consiste en el uso de la cromatografía de intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio aniónico da como resultado un buen rendimiento de hidrato de carbono GAS con una contaminación limitada de ácido hialurónico, proteína y ácido nucleico.

El rendimiento de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico es generalmente mayor que 70 % (p. ej. > 75 %,> 80 %,> 85 %,> 90 %). Las limitaciones prácticas significan que el rendimiento podría no superar el 90 % (por ejemplo podría ser <90 %, <80 %, <75 %, etc.).

La invención implica un procedimiento para la purificación de un hidrato de carbono GAS de la bacteria *Streptococcus pyogenes,* en el que el procedimiento proporciona una composición que comprende un nivel de contaminación con ácido hialurónico que es menos de 200 ng/ml (p. ej. ≤150 ng/ml, ≤100 ng/ml, ≤90 ng/ml, ≤80 ng/ml, ≤75 ng/ml, ≤60 ng/ml, ≤50 ng/ml, ≤40 ng/ml, ≤25 ng/ml, ≤20 ng/ml, ≤10 ng/ml etc.). Generalmente, el nivel de contaminación con ácido hialurónico es menos de 100 ng/ml, en particular menos de 80 ng/ml. El nivel de contaminación con ácido hialurónico también puede expresarse en términos del peso de ácido hialurónico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS que está presente en la muestra purificada. De esta manera, la invención implica un procedimiento para la purificación de un hidrato de carbono GAS de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, en el que el procedimiento proporciona una composición que comprende un nivel de contaminación con ácido hialurónico que es menos de 5 % (p. ej. ≤4 %, ≤3 %, ≤2 %, ≤1 %, ≤0,75 %, ≤0,5 %, ≤0,25 %, ≤0,1 % etc.) en peso de ácido hialurónico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. Generalmente, el nivel de contaminación con ácido hialurónico es menos de 1 % en peso de ácido hialurónico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. También se pueden obtener niveles inferiores a este, p. ej. iguales o menores que 0,005 % en peso de ácido hialurónico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS.

La invención también incluye un procedimiento para la purificación del hidrato de carbono GAS de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, en el que el procedimiento proporciona una composición que comprende un nivel de contaminación con poli-ramnosa que es menos de 50 % (p. ej. ≤40 %, ≤30 %, ≤25 %, ≤20 %, ≤15 %, ≤10 %, ≤8 %, ≤6 %, ≤5 %, ≤4 %, ≤2 %, ≤1 % etc.) en peso de poli-ramnosa con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. Generalmente, el nivel de contaminación con poli-ramnosa es menos de 20 % en peso de poli-ramnosa con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. También se pueden obtener niveles inferiores a este, por ejemplo, igual o menor que 5 % en peso de poli-ramnosa con respecto al peso del hidrato de carbono GAS.

La invención también incluye un procedimiento para la purificación del hidrato de carbono GAS de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, en el que el procedimiento proporciona una composición que comprende un nivel de contaminación con proteína que es menos de 4,0 % (p. ej. ≤3,5 %, ≤3,1 %, ≤3,0 %, ≤2,5 %, ≤2,0 %, ≤1,5 %, ≤1,0 %, etc.) en peso de proteína con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. Generalmente, el nivel de contaminación con proteína es de alrededor 2 % en peso de proteína con respecto al peso del hidrato de carbono GAS.

La invención también incluye un procedimiento para la purificación del hidrato de carbono GAS de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, en el que el procedimiento proporciona una composición que comprende un nivel de contaminación con ácido nucleico que es menos de 5 % (p. ej. ≤4 %, ≤3 %, ≤2 %, ≤1 %, ≤0,75 %, ≤0,5 %, ≤0,25 %,

≤0,1 % etc.) en peso de ácido nucleico con respecto al peso de hidrato de carbono GAS. Generalmente, el nivel de contaminación con ácido nucleico es menos de 1 % en peso de ácido nucleico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. También se pueden obtener niveles por debajo de este, por ejemplo, menos de 0,5 % en peso de ácido nucleico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS.

La invención también incluye un procedimiento para la purificación del hidrato de carbono GAS de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, en el que (a) el nivel de contaminación con ácido hialurónico es menos de 200 ng/ml o 5 % (como se describió anteriormente); (b) el nivel de contaminación con poli-ramnosa es menos de 50 % (como se describió anteriormente); (c) el nivel de contaminación de proteína es menos de 4,0 % (como se describió anteriormente) y (d) el nivel de contaminación con ácido nucleico es menos de 5 % (como se describe más arriba).

La invención también proporciona una composición que comprende un hidrato de carbono GAS de *Streptococcus pyogenes*, obtenible por los procedimientos de la invención.

Una composición de hidrato de carbono GAS que comprende *Streptococcus pyogenes* puede comprender un nivel de contaminación con ácido hialurónico que es menos de 200 ng/ml (p. ej. ≤150 ng/ml, ≤100 ng/ml, ≤90 ng/ml, ≤80 ng/ml, ≤75 ng/ml, ≤60 ng/ml, ≤50 ng/ml, ≤40 ng/ml, ≤25 ng/ml, ≤20 ng/ml ≤10 ng/ml etc.). Generalmente, el nivel de contaminación con ácido hialurónico es menos de 100 ng/ml, en particular menos de 80 ng/ml. El nivel de contaminación con ácido hialurónico también puede expresarse en términos del peso de ácido hialurónico con respecto al peso total de la composición. De esta manera, la composición que comprende un hidrato de carbono GAS de *Streptococcus pyogenes*, puede comprender un nivel de contaminación con ácido hialurónico que es menos de 5 % (p. ej. ≤4 %, ≤3 %, ≤2 %, ≤1 %, ≤0,75 %, ≤0,5 %, ≤0,25 %, ≤0,1 % etc.) en peso de ácido hialurónico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. Generalmente, el nivel de contaminación con ácido hialurónico es menos de 1 % en peso de ácido hialurónico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. También se pueden obtener niveles por debajo de este, por ejemplo, igual o menos de 0,005 % en peso de ácido hialurónico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS.

Una composición que comprende hidrato de carbono GAS de *Streptococcus pyogenes* puede comprender un nivel de contaminación con poli-ramnosa que es menos de 50 % (p. ej. ≤40 %, ≤30 %, ≤25 %, ≤20 %, ≤15 %, ≤10 %, ≤8 %, ≤6 %, ≤5 %, ≤4 %, ≤2 %, ≤1 % etc.) en peso de poli-ramnosa con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. Generalmente, el nivel de contaminación con poli-ramnosa es menos de 20 % en peso de poli-ramnosa con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. También se pueden obtener niveles por debajo de este, por ejemplo, igual o menos de 5 % en peso de poli-ramnosa con respecto al peso del hidrato de carbono GAS.

Una composición que comprende hidrato de carbono GAS de *Streptococcus pyogenes* puede comprender un nivel de contaminación con proteína que es menos de 4,0 % (p. ej. ≤3,5 %, ≤3,1 %, ≤3,0 %, ≤2,5 %, ≤2,0 %, ≤1,5 %, ≤1,0 %, etc.) en peso de proteína con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. Generalmente, el nivel de contaminación con proteína es de alrededor 2 % en peso de proteína con respecto al peso del hidrato de carbono GAS.

Una composición que comprende hidrato de carbono GAS de *Streptococcus pyogenes* puede comprender un nivel de contaminación con ácido nucleico que es menos de 5 % (p. ej. ≤4 %, ≤3 %, ≤2 %, ≤1 %, ≤0,75 %, ≤0,5 %, ≤0,25 %, ≤0,1 % etc.) en peso de ácido nucleico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. Generalmente, el nivel de contaminación con ácido nucleico es menos de 1 % en peso de ácido nucleico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS. También se pueden obtener niveles por debajo de este, por ejemplo, menos de 0,5 % en peso de ácido nucleico con respecto al peso del hidrato de carbono GAS.

Una composición puede comprender hidrato de carbono GAS de *Streptococcus pyogenes*, en la que (a) el nivel de contaminación con ácido hialurónico es menos de 200 ng/ml o 5 % (como se ha descrito anteriormente); (b) el nivel de contaminación con poli-ramnosa es menos de 50 % (como se ha descrito anteriormente); (c) el nivel de contaminación con proteína es menos de 4,0 % (como se ha descrito anteriormente) y (d) el nivel de contaminación con ácido nucleico es menos de 5 % (como se ha descrito anteriormente).

El hidrato de carbono GAS

El hidrato de carbono GAS de *S. pyogenes* (también conocido como el polisacárido de la pared celular GAS o GASP) presenta generalmente una estructura ramificada con una cadena principal de L-ramnopiranosa (Rha*p*) que consiste en enlaces alfa-(1→2) y alfa-(1→3) alternantes y residuos beta-(1→) de N-acetilglucosamina (Glc*p*NAc) conectados a anillos de ramnosa alternantes (Figura 1 y [14]). Se han descrito estreptococos variantes del grupo A en los que está presente la cadena principal de Rha*p* pero no hay ramas Glc*p*NAc (es decir, poli-ramnosa, Figura 2 y [6]). La invención implica preferentemente un hidrato de carbono GAS de *S. pyogenes* en lugar de estreptococos variantes del grupo A. En efecto, el procedimiento de purificación de la presente invención es particularmente eficaz en la reducción de la contaminación con poli-ramnosa del hidrato de carbono GAS de *S. pyogenes*.

Los sacáridos purificados de acuerdo con la invención estarán generalmente en su forma nativa, pero pueden haber sido modificados. Por ejemplo, el sacárido puede ser más corto que el hidrato de carbono GAS nativo o puede estar modificado químicamente.

Por lo tanto el sacárido utilizado de acuerdo con la invención puede ser un hidrato de carbono GAS sustancialmente de longitud completa, tal como se encuentra en la naturaleza, o puede tener una menor longitud que la longitud natural. Los polisacáridos de longitud completa pueden despolimerizarse para dar fragmentos más cortos para su uso con la invención, por ejemplo, por hidrólisis en un ácido suave, por calentamiento, cromatografía de exclusión de tamaño, etc. Se ha propuesto el uso de un fragmento corto que se cree que corresponde a la unidad terminal del hidrato de carbono GAS para su uso en una vacuna [15]. De acuerdo con ello, en la presente invención se contemplan los fragmentos cortos. Sin embargo, se prefiere el uso de sacáridos sustancialmente de longitud completa. Los sacáridos purificados de acuerdo con la invención tienen generalmente un peso molecular de aproximadamente 10, en particular aproximadamente 7,5-8,5 kDa. Las masas moleculares se pueden medir por HPLC, por ejemplo, SEC-HPLC usando una columna TSK Gel G3000SW (Sigma) de acuerdo con los estándares de pululano, tales como los disponibles de Polymer Standard Service [16]. Las condiciones típicas para esta medición implican elución isocrática con un tampón de elución que comprende NaPi 100 mM, NaCl 100 mM y acetonitrilo 5 % a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. La presencia de un hidrato de carbono GAS puede ser detectada mediante la medición de la absorbancia a 214 nm.

El sacárido puede modificarse químicamente respecto al hidrato de carbono GAS como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el sacárido puede ser des-N-acetilado (parcial o totalmente), N-propionado (parcial o totalmente), etc. El efecto de des-acetilación etc., por ejemplo, sobre la inmunogenicidad, puede evaluarse mediante ensayos de rutina.

Material de partida

El procedimiento de la invención comienza generalmente con el carbohidrato GAS en forma acuosa, por ejemplo, como una suspensión acuosa, que comprende además ácido hialurónico y/o poli-ramnosa. En la suspensión pueden estar presentes proteínas y/o ácidos nucleicos de estreptococos. Generalmente, la suspensión comprenderá ácido hialurónico, poli-ramnosa, proteínas y ácidos nucleicos. El ácido hialurónico por lo general se deriva del polisacárido capsular de *Streptococcus pyogenes*.

Generalmente, el material de partida se preparará mediante el tratamiento de las propias bacterias (o material que contiene la pared celular bacteriana), de manera que se libere el hidrato de carbono GAS. Por ejemplo, las bacterias se pueden cosechar a partir de un cultivo bacteriano, preferentemente en la fase estacionaria. El cultivo puede ser desactivado por calor antes de la cosecha. Por ejemplo, los inventores han encontrado que el tratamiento térmico a 90 °C durante 60 min es adecuado para la desactivación del cultivo. La cosecha puede comprender la centrifugación del cultivo y la resuspensión del sedimento bacteriano, por ejemplo, en agua o en un tampón de solución salina. Antes de la centrifugación, el cultivo puede ser tratado por filtración de flujo tangencial, por ejemplo usando un filtro de cartucho de fibra hueca de 0,2 µm [8]. La centrifugación puede llevarse a cabo a cualquier velocidad adecuada, por ejemplo, a entre 100 y 10.000 g. Se ha encontrado que una velocidad de 300 g es eficaz. Una velocidad de 3000 g se menciona en la referencia 8. Si las bacterias se resuspenden en tampón de solución salina, la suspensión se puede diluir con agua antes de un tratamiento adicional [8].

El hidrato de carbono GAS puede ser liberado de las bacterias por diversos procedimientos, incluyendo el tratamiento químico, físico o enzimático. Un tratamiento químico típico es el tratamiento con ácido reductor, por ejemplo, usando nitrito de sodio y ácido acético glacial [por ejemplo, como se describe en las referencias. 4, 5, 7 y 10], que libera el hidrato de carbono GAS de la bacteria. Generalmente, se añaden volúmenes iguales de nitrato de sodio 4 N y ácido acético glacial a la suspensión bacteriana y la mezcla se agita durante una duración de tiempo adecuada, p. ej. 1 hora. El tratamiento se lleva a cabo a una temperatura adecuada, p. ej. 37 °C. El pH final de la mezcla es generalmente de alrededor 3,0. El pH de la mezcla se puede neutralizar a alrededor de 6 a 7, p. ej. utilizando hidróxido de sodio 4 M. La mezcla se puede diluir con agua [8].

Filtración y ultrafiltración

El hidrato de carbono GAS obtenido después del cultivo, por ejemplo mediante el tratamiento con ácido reductor descrito anteriormente, generalmente será impuro y estará contaminado con ácido hialurónico y/o poli-ramnosa. También pueden estar presentes proteínas y/o ácidos nucleicos de estreptococos. Se puede usar una o más etapas de filtración para purificar el hidrato de carbono GAS mediante la eliminación de las especies de alto peso molecular. Por ejemplo, los inventores han encontrado que se puede usar una etapa de filtración que implica la filtración ortogonal para eliminar las impurezas del hidrato de carbono GAS, que se retienen en el filtrado. Generalmente, la filtración ortogonal se lleva a cabo utilizando un filtro de 0,65 µm. Por ejemplo, se puede usar una cápsula Sartopure GF2™ (Sartorius) (con un área de 0,2 m^2). Sin embargo, también se puede utilizar un filtro de 0,2 µm. Para mejorar el rendimiento, se puede eliminar cualquier filtrado residual del filtro y combinarse con el resto del filtrado. Esta eliminación se puede hacer, por ejemplo, mediante la aplicación de una fuerza motriz (por ej., peristáltica o presión) al filtro o alimentando el sistema con agua destilada.

También se puede usar una o más etapas de ultrafiltración para purificar el hidrato de carbono GAS mediante la eliminación de especies de bajo peso molecular. La ultrafiltración también puede concentrar el hidrato de carbono GAS. Preferentemente, la una o más etapas de ultrafiltración se llevan a cabo después de la etapa(o etapas) de filtración anteriores. Los inventores han encontrado que una etapa de diafiltración, por ejemplo, por filtración de flujo

tangencial, es particularmente eficaz para la eliminación de impurezas del hidrato de carbono GAS, que es retenido en el material retenido. La solución de hidrato de carbono GAS se puede concentrar, por ejemplo, unas 15-20 veces, antes de la diafiltración. La filtración de flujo tangencial se lleva a cabo adecuadamente contra NaCl 1 M (por ej. contra aproximadamente 10 volúmenes) y después agua (por ej. contra otros 10 volúmenes). La filtración de flujo tangencial puede llevarse a cabo contra agua utilizando una membrana de 3, 5, 10 o 30 kDa de corte. Por ejemplo, se puede utilizar una membrana Hydrosart™ (Sartorius) de 5 kDa de corte (con un área de la membrana de 0,1 m^2). Hydrosart™ es una membrana de celulosa estabilizada que es hidrófila y es estable en amplio intervalo de pH. Sin embargo, los inventores han encontrado que la filtración de flujo tangencial usando una membrana de corte de 30 kDa es más adecuada para procedimientos a gran escala. Esta filtración de flujo tangencial también permite una mejor eliminación de la contaminación de proteínas y tiempos de filtración más cortos, sin pérdida sustancial de hidrato de carbono GAS. Después de la filtración de flujo tangencial, el material retenido se puede concentrar, por ej. aproximadamente 5 veces. Para mejorar el rendimiento, la membrana se puede lavar, por ej. dos veces, con agua destilada, lo que corresponde al volumen muerto de la membrana y los lavados se añaden al material retenido.

Después de la filtración y/o ultrafiltración, la preparación del hidrato de carbono GAS puede concentrarse. Generalmente, la preparación del hidrato de carbono GAS se somete a diafiltración contra agua antes de un tratamiento adicional.

Cromatografía de intercambio aniónico

El procedimiento de la invención comprende una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Los inventores han encontrado que la cromatografía de intercambio aniónico es particularmente eficaz en la eliminación de la contaminación con ácido hialurónico, proteína y ácido nucleico del hidrato de carbono GAS, manteniendo al mismo tiempo un buen rendimiento del sacárido.

La etapa de cromatografía de intercambio aniónico se puede realizar después de las etapas de filtración y/o ultrafiltración descritas anteriormente.

La cromatografía de intercambio aniónico se puede llevar a cabo usando cualquier matriz de intercambio aniónico adecuada. Matrices de intercambio aniónico comúnmente utilizadas son resinas tales como las resinas Q (a base de aminas cuaternarias) y resinas DEAE (a base de dietilaminoetano). Los presentes inventores han encontrado que las resinas Q (por ej. resinas Q-Sepharose™ XL o Q-Sepharose™ FF (GE Healthcare)) son particularmente apropiadas, aunque se pueden usar otras resinas. Una cantidad apropiada de resina para la cantidad de material a ser purificada puede determinarse mediante experimentos de rutina sin carga indebida. Por ejemplo, los inventores han encontrado que 1 ml de resina por cada 0,5 mg o 1 mg de hidrato de carbono GAS puede ser eficaz.

Tampones de partida y tampones de fase móvil apropiados para la cromatografía de intercambio aniónico también se pueden determinar mediante experimentos de rutina sin carga indebida. Tampones típicos para su uso en la cromatografía de intercambio aniónico incluyen N-metil piperazina, piperazina, L-histidina, bis-Tris, bis-Tris propano, trietanolamina, Tris, N-metil-dietanolamina, dietanolamina, 1,3-diaminopropano, etanolamina, piperidina y tampones de fosfato. Los inventores han encontrado que, ventajosamente, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se puede realizar en condiciones que permiten el “flujo continuo” del hidrato de carbono GAS, en el que las impurezas se unen a la matriz de intercambio aniónico, mientras que el hidrato de carbono GAS fluye directamente a través del sistema en el eluyente. El uso de estas condiciones simplifica el procedimiento de purificación, ya que no hay necesidad de usar un tampón de fase móvil de fuerza iónica creciente ni aumentar el pH etc. para eluir el hidrato de carbono GAS de la matriz. Las condiciones apropiadas para el flujo continuo mediante cromatografía de intercambio aniónico pueden ser determinadas por experimentos de rutina sin carga indebida. Los tampones de fosfato, por ej. un tampón de fosfato de sodio, pueden ser adecuados para la fase móvil para la cromatografía de intercambio aniónico. El tampón puede estar en cualquier concentración adecuada. Por ejemplo, se ha encontrado que es adecuado fosfato de sodio 10 mM.

Los inventores han encontrado que la adición de alcohol al tampón de la fase móvil puede aumentar el rendimiento del hidrato de carbono GAS. Los inventores también han encontrado que el alcohol en el tampón de la fase móvil puede reducir la turbidez en la preparación del hidrato de carbono GAS. Sin embargo, los inventores han encontrado que el uso de un tampón de fase móvil que no contiene nada de alcohol es más adecuado para procedimientos a gran escala. Cuando se utiliza, cualquier concentración adecuada de alcohol puede estar presente en el tampón de la fase móvil. Por ejemplo, el alcohol puede ser añadido al tampón de la fase móvil para dar una concentración final de alcohol de entre 5 % y 50 % (p. ej. alrededor de 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %) en volumen. Generalmente, el alcohol se añade al tampón de la fase móvil para dar una concentración final de alcohol de entre 15 % y 25 %, particularmente 20 %, en volumen. El alcohol es preferentemente un alcohol inferior, tal como metanol, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc. La selección de un alcohol apropiado puede ser probada empíricamente, sin carga indebida, pero se prefieren alcoholes tales como el etanol y el isopropanol (propan-2-ol), en lugar de alcoholes tales como fenol. Generalmente, el alcohol será etanol. El alcohol se puede añadir en forma pura o se puede añadir en una forma diluida con un disolvente miscible (por ej. agua). Mezclas de disolventes preferidas son mezclas alcohol:agua, con una relación preferida de entre alrededor de 70:30 y alrededor de 95:5 (p. ej. 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

Las fracciones de eluyente que contienen hidrato de carbono GAS pueden determinarse midiendo la absorción UV a 215 nm. El material eluido está altamente purificado con respecto a la preparación de hidrato de carbono GAS antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Todas las fracciones que contienen hidrato de carbono GAS pueden ser combinadas antes de su tratamiento.

La etapa de cromatografía de intercambio aniónico se puede repetir, por ej. 1, 2, 3, 4 o 5 veces. Sin embargo, generalmente la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se llevará a cabo una vez.

Filtración en gel

El procedimiento de la invención puede implicar una o más etapas de filtración en gel. Esta filtración en gel se utiliza para seleccionar moléculas de hidrato de carbono GAS de una longitud particular y para reducir aún más la contaminación, en particular de proteínas. Sin embargo, los inventores han encontrado que, contrariamente a la ref. 6, no se requiere una etapa de filtración en gel para obtener un hidrato de carbono GAS de alta pureza. Por consiguiente, esta etapa puede ser omitida de los procedimientos de la invención. La omisión de esta etapa puede facilitar la escalabilidad del procedimiento.

Por ejemplo, la etapa(o etapas) de filtración en gel puede llevarse a cabo después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico descrita anteriormente.

La etapa(o etapas) de filtración en gel puede llevarse a cabo utilizando cualquier matriz de filtración en gel adecuada. Las matrices de filtración en gel comúnmente utilizadas se basan en geles de dextrano, geles de agarosa, geles de poliacrilamida, geles de poliacriloilmorfolina y geles de poliestireno etc. También se pueden usar geles de dextrano reticulado y geles de poliacrilamida/agarosa mixtos. Los presentes inventores han encontrado que los geles de dextrano (p. ej. un gel de Sephacryl S100 o un gel Sephadex™ G50 (ambos de GE Healthcare)) son particularmente adecuados, aunque pueden usarse otros geles. Una cantidad apropiada de gel para la cantidad de material a ser purificado puede determinarse mediante experimentos de rutina sin carga indebida. Por ejemplo, los inventores han encontrado que 1 ml de gel por cada 0,2 mg de hidrato de carbono GAS puede ser eficaz. Del mismo modo, una cantidad apropiada de preparación de hidrato de carbono GAS para cualquier columna de filtración en gel dada se puede determinar mediante experimentos de rutina sin carga indebida. Generalmente, el volumen de preparación del hidrato de carbono GAS aplicado a la columna de filtración en gel no excederá el 5 % del volumen de la columna.

Tampones de fase móvil apropiados para la filtración en gel se pueden determinar mediante experimentos de rutina sin carga indebida. Tampones típicos para su uso en la filtración en gel incluyen N-metil piperazina, piperazina, L-histidina, bis-Tris, bis-Tris propano, trietanolamina, Tris, N-metil-dietanolamina, dietanolamina, 1,3-diaminopropano, etanolamina, piperidina y tampones de fosfato. Por ejemplo, tampones de fosfato, por ejemplo, un tampón de fosfato de sodio, pueden ser adecuados para la fase móvil. El tampón puede estar en cualquier concentración adecuada. Por ejemplo, se puede usar para la fase móvil fosfato de sodio 10 mM.

Los inventores han encontrado que, ventajosamente, la filtración en gel se puede realizar utilizando el mismo tampón de fase móvil que en la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. El uso de este tampón simplifica el procedimiento de purificación, ya que no hay necesidad de preparar un tampón diferente. Por ejemplo, un tampón de fosfato sódico 10 mM se puede usar para la fase móvil de dos etapas.

Una vez más, se prefiere añadir un alcohol al tampón de la fase móvil para la filtración en gel. Esta adición puede aumentar el rendimiento de hidrato de carbono GAS y/o reducir la turbidez en la preparación de hidrato de carbono GAS. Cualquier concentración adecuada de alcohol puede utilizarse en el tampón de fase móvil. Por ejemplo, el alcohol puede ser añadido al tampón de la fase móvil para dar una concentración final de alcohol de entre 5 % y 50 % (por ej. alrededor de 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %) en volumen. Generalmente, se añade el alcohol al tampón de la fase móvil para dar una concentración final de alcohol de entre 15 y 25, en particular 20 %, por volumen. El alcohol es preferentemente un alcohol inferior, tal como metanol, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc. La selección de un alcohol apropiado puede ser probada empíricamente, sin carga indebida, pero se prefieren alcoholes tales como el etanol y el isopropanol (propan-2-ol), en lugar de alcoholes tales como fenol. Generalmente, el alcohol será etanol. El alcohol se puede añadir en forma pura o se puede añadir en una forma diluida con un disolvente miscible (por ej. agua). Mezclas de disolventes preferidas son alcohol:agua, con una relación preferida de entre alrededor 70:30 y alrededor 95:5 (p. ej. 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

Las fracciones de eluyente que contienen hidrato de carbono GAS pueden determinarse midiendo la absorción UV a 215 nm. Los inventores han descubierto que el hidrato de carbono GAS puede estar presente en el eluyente como dos picos: un pico correspondiente a sacáridos de hidrato de carbono GAS de alto peso molecular y otro pico (a menudo más pequeño) que corresponde a los sacáridos del hidrato de carbono GAS de bajo peso molecular. Generalmente, se eligen las fracciones que contienen los sacáridos de hidrato de carbono GAS de alto peso molecular si la preparación de hidrato de carbono GAS se va a procesar para la posterior preparación de vacunas. Como alternativa, las fracciones que contienen tanto los sacáridos de hidrato de carbono GAS de alto peso molecular como los de bajo peso molecular podrán mezclarse antes de su tratamiento.

La preparación del hidrato de carbono GAS se puede diafiltrar contra agua antes del tratamiento posterior.

Concentración

Además de, o en lugar de, la una o más etapas de filtración en gel, el procedimiento de la invención puede implicar una o más etapas de concentración del hidrato de carbono GAS. Esta concentración es útil para obtener una muestra de la concentración correcta para la posterior conjugación del hidrato de carbono GAS con una molécula vehículo, como se describe a continuación. Sin embargo, los inventores han encontrado que esta etapa de concentración no es necesaria para obtener hidrato de carbono GAS de alta pureza. En consecuencia, esta etapa puede ser omitid de los procedimientos de la invención.

Los inventores han encontrado que el uso de una o más etapas de concentración del hidrato de carbono GAS es más adecuado que el uso de filtración en gel para los procedimientos a gran escala. El uso de una o más etapas de concentración del hidrato de carbono GAS es particularmente adecuado cuando el hidrato de carbono GAS se ha purificado por filtración de flujo tangencial usando una membrana de corte de 30 kDa como se ha descrito anteriormente. Los inventores han encontrado que el uso de esta etapa de filtración de flujo tangencial significa que no es necesario incluir la etapa(o etapas) de filtración en gel en el procedimiento para eliminar las impurezas del hidrato de carbono GAS, particularmente poli-ramnosa.

Por ejemplo, la etapa(o etapas) de concentración puede llevarse a cabo después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico descrita anteriormente. Si se usa además de la etapa (o etapas) de filtración en gel descrita anteriormente, la etapa(o etapas) de concentración puede llevarse a cabo antes o después de la etapa (o etapas) de filtración en gel descrita anteriormente. Sin embargo, por lo general, la etapa(o etapas) de concentración se utiliza en lugar de la etapa(o etapas) de filtración en gel.

La etapa(o etapas) de concentración puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, los autores de la invención han encontrado que la etapa(o etapas) de concentración puede ser la etapa (o etapas) de ultrafiltración como se describió anteriormente, por ejemplo, la filtración de flujo tangencial usando una membrana de 5 o 10 kDa de corte. Por ejemplo, se puede utilizar una membrana Hydrosart™ (Sartorius) de 10 kDa de corte (con un área de membrana de 200 cm^2). Generalmente se utiliza una membrana Hydrosart™ (Sartorius) de 5 kDa de corte (con un área de membrana de 200 cm^2). Los inventores han encontrado que una membrana de corte de 5 kDa puede proporcionar un mayor rendimiento que una membrana de 10 kDa de corte. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que una membrana de 5 kDa proporciona un corte que está más lejos de la masa del hidrato de carbono GAS y en consecuencia un mayor rendimiento.

La preparación del hidrato de carbono GAS puede ser diafiltrada frente al agua antes de su tratamiento. Sin embargo, los inventores han descubierto que una diafiltración adicional puede tener como resultado la pérdida del hidrato de carbono GAS en el permeado.

Tratamiento posterior del hidrato de carbono GAS

Después de la purificación, el sacárido se puede tratar adicionalmente para eliminar los contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que incluso no es aceptable la mínima contaminación (por ej. para la producción de vacunas humanas).

El sacárido puede ser sometido a secado al vacío. Este tratamiento se usará generalmente no para estabilizar el sacárido para el almacenamiento, sino para secar el sacárido y eliminar cualquier alcohol residual.

Se pueden realizar más rondas de filtración.

El hidrato de carbono GAS purificado tiene generalmente un grado de polimerización de entre 10 y 30, p. ej. entre 20 y 24 (tal como se mide por la concentración de grupos aldehído en la muestra purificada [17]). Sin embargo, este polisacárido puede ser despolimerizado para formar oligosacáridos. Los oligosacáridos pueden ser preferidos a los polisacáridos para su uso en vacunas. La despolimerización del polisacárido en oligosacárido puede ocurrir antes o después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Si se lleva a cabo la despolimerización, los productos generalmente se dimensionan con el fin de eliminar oligosacáridos de corta longitud. Esto se puede lograr de varias maneras, tales como ultrafiltración seguida por cromatografía de intercambio iónico. Cuando la composición de la invención incluye un sacárido despolimerizado, se prefiere que la despolimerización preceda a cualquier conjugación.

Si los residuos de D-N-acetilglucosamina en los hidratos de carbono GAS nativos han sido des-N-acetilados, entonces los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa de re-N-acetilación. La re-N-acetilación controlada puede llevarse a cabo convenientemente utilizando un reactivo tal como anhídrido acético $(CH_3CO)_2O$, por ej. en bicarbonato de amonio 5 % [18].

Estos pasos adicionales generalmente se pueden realizar a temperatura ambiente.

Almacenamiento

La preparación de hidrato de carbono GAS puede ser liofilizada, por ejemplo, mediante secado por congelación al vacío, o congelada en solución (por ej. como el eluyente de la etapa de concentración final, si se incluye) para el almacenamiento en cualquier etapa durante el procedimiento de purificación. En consecuencia, no es necesario que la preparación sea transferida inmediatamente de una etapa del procedimiento a otra. Por ejemplo, si la preparación del hidrato de carbono GAS ha de ser purificada por filtración y/o ultrafiltración, entonces esta puede ser liofilizad o congelada en solución antes de esta purificación. Del mismo modo, el hidrato de carbono GAS puede ser liofilizado o congelado en solución antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Si la preparación del hidrato de carbono GAS ha de ser purificada por filtración en gel, entonces puede ser liofilizada o congelada en solución antes de esta etapa. Del mismo modo, si la preparación del hidrato de carbono GAS se ha de concentrar, entonces esta puede ser liofilizada o congelada en solución antes de esta etapa. La preparación liofilizada se reconstituye en una solución apropiada antes del tratamiento adicional. Del mismo modo, la solución congelada se descongela antes del tratamiento adicional.

El hidrato de carbono GAS purificado obtenido por el procedimiento de la invención puede ser procesado para su almacenamiento en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, el sacárido puede ser liofilizado como se ha descrito anteriormente. De modo alternativo, el sacárido se puede almacenar en solución acuosa, generalmente a temperatura baja, por ejemplo a -20 °C. Convenientemente, el sacárido se puede almacenar como eluyente de las etapas de cromatografía de intercambio aniónico, filtración en gel o concentración.

Conjugación

El hidrato de carbono GAS final purificado de la invención se puede utilizar como un antígeno sin más modificación p. ej. para su uso en ensayos de diagnóstico *in vitro*, para su uso en la inmunización, etc.

Para los propósitos de vacunación, sin embargo, se prefiere conjugar el sacárido con una molécula vehículo, tal como una proteína. En general, la conjugación covalente de los sacáridos con vehículos mejora la inmunogenicidad de los sacáridos, ya que los convierte de antígenos T-independientes en antígenos T-dependientes, permitiendo de este modo el cebado de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas [por ej. ref. 19] y es una técnica bien conocida [por ej. revisada en las refs. 20 a 28]. Así, los procedimientos de la invención pueden incluir la etapa adicional de conjugar el hidrato de carbono GAS purificado con una molécula vehículo, por ejemplo, una proteína transportadora.

En un aspecto, la invención proporciona por lo tanto un conjugado de (i) un carbohidrato GAS obtenible por el procedimiento de la invención y (ii) una molécula vehículo.

La molécula vehículo se puede conjugar covalentemente con el hidrato de carbono GAS directamente o mediante un enlazador.

Los enlaces directos del hidrato de carbono GAS con proteínas vehículo se ha descrito, por ej. en las refs. 6 y 8. El procedimiento de la técnica anterior típico para la conjugación de un hidrato de carbono GAS implica la aminación reductora de un sacárido purificado con una proteína vehículo tal como el toxoide del tétanos (TT) [por ej. como se describe en la ref. 8 por referencia a la ref. 29]. La aminación reductora implica un grupo amina en la cadena lateral de un aminoácido en el vehículo y un grupo aldehído en el sacárido. El sacárido de hidrato de carbono GAS incluye un grupo aldehído en un residuo terminal. En consecuencia, este grupo puede ser usado para la conjugación con el vehículo [por ej. como se discutió en la ref. 8]. Como alternativa, los grupos aldehído adicionales se pueden generar antes de la conjugación, por ejemplo, por oxidación del extremo no reductor del sacárido.

Los enlaces a través de un grupo enlazador se pueden hacer utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las refs. 30 y 31. Un tipo preferido de enlace es un enlazador de ácido adípico, que se puede formar por acoplamiento de un grupo $-NH_2$ libre (por ej. introducido en un hidrato de carbono GAS por aminación) con ácido adípico (usando, por ejemplo, la activación de diimida) y después acoplando una proteína al intermedio resultante sacárido-ácido adípico [32, 33, 34]. Otro tipo preferido de enlace es un enlazador carbonilo, que se puede formar por reacción de un grupo hidroxilo libre de un hidrato de carbono GAS modificado con CDI [35, 36] seguido de la reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otros enlazadores incluyen β-propionamido [37], nitrofenil-etilamina [38], haluros de haloacilo [39], enlaces glicosídicos [40], ácido 6-aminocaproico [41], N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [42], dihidrazida de ácido adípico ADH [43], restos C_4 a C_{12} [44], etc. También se puede usar la condensación de carbodiimida [45]. Un procedimiento de conjugación alternativo implica el uso de grupos $-NH_2$ en el sacárido (ya sea de la des-N-acetilación o después de la introducción de aminas) conjuntamente con los enlazadores bifuncionales, como se describe para el sacárido capsular de GBS en la ref. 46.

Otros procedimientos adecuados para la conjugación del hidrato de carbono GAS se discuten en la ref. 6.

Las proteínas vehículo preferidas son toxinas bacterianas, tales como las toxinas de la difteria o el tétanos, o toxoides o mutantes de las mismas. Estas se utilizan comúnmente en las vacunas conjugadas. La toxina mutante de la difteria CRM_{197} es particularmente preferida [47].

Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen el complejo de proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [48], péptidos sintéticos [49,50], proteínas de choque térmico [51,52], proteínas de pertussis [53,54], citocinas [55], linfocinas [55], hormonas [55], factores de crecimiento [55], seroalbúmina humana (preferentemente recombinante), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de linfocitos T $CD4^+$ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos [56], tales como N19 [57], proteína D de *H. influenzae* [58-60], neumolisina [61] o sus derivados no tóxicos [62], proteína de superficie neumocócica PspA [63], proteínas de captación de hierro [64], toxina A o B de *C. difficile* [65], exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) [66], una proteína de GBS [112], una proteína de GAS [67] etc.

La unión al vehículo se hace preferentemente a través de un grupo $-NH_2$, por ej. en la cadena lateral de un residuo de lisina en una proteína vehículo o de un residuo de arginina. La unión también puede ser a través de un grupo –SH, por ejemplo, en la cadena lateral de un residuo de cisteína.

Es posible utilizar más de una proteína vehículo para el antígeno carbohidrato GAS por ej. para reducir el riesgo de supresión del vehículo. Por lo tanto los sacáridos del hidrato de carbono GAS pueden estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM_{197} y otros conjugados con toxoide del tétanos. En general, sin embargo, se prefiere utilizar la misma proteína vehículo para todos los sacáridos.

Una proteína vehículo simple podría llevar más de un antígeno de sacárido [68, 69].

Los conjugados con una relación sacárido:proteína (p/p) de entre 1:10 (es decir, exceso de proteína) y 10:1 (es decir, exceso de sacárido) son los preferidos. Se prefieren relaciones entre 1:5 y 5:1, como las relaciones entre 1:5 y 1:2,5.

Los conjugados se pueden usar conjuntamente con un vehículo libre [70]. Cuando una proteína vehículo dada está presente tanto en forma libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferentemente no más de 5 % de la cantidad total de la proteína vehículo en la composición como un todo y más preferentemente está presente en menos de 2 % en peso.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados se pueden separar. Hay muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración etc. [Véase también las refs. 71 y 72, etc.].

Combinaciones de conjugados y otros antígenos

Los sacáridos preparados por los procedimientos de la invención (en particular, después de la conjugación como se describió anteriormente) se pueden mezclar, por ejemplo, entre sí y/o con otros antígenos. Así, los procedimientos de la invención pueden incluir la etapa adicional de mezclar el sacárido con uno o más antígenos adicionales. Se pueden mezclar múltiples conjugados de hidrato de carbono GAS diferentes. La composición se producirá preparando conjugados separados y combinando después los conjugados.

El antígeno(s) adicional puede comprender antígenos de patógenos no GAS. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden comprender además uno o más antígenos no GAS, incluyendo antígenos bacterianos, virales o parasitarios adicionales. Estos pueden ser seleccionados entre los siguientes:

- un antígeno de proteína de *N. meningitidis* serogrupo B, tales como los de las refs. 73 a 79, siendo particularmente preferidos la proteína '287' (véase más abajo) y derivados (por ej. 'ΔG287').
- una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como la descrita en las refs. 80, 81, 82, 83 etc.
- un antígeno de sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como el oligosacárido desvelado en la referencia 84 del serogrupo C o los oligosacáridos de la ref. 85.
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ej. refs. 86-88; capítulos 22 y 23 de la ref. 95].
- un antígeno del virus de hepatitis A, tal como el virus inactivado [por ej. 89, 90; capítulo 15 de la ref. 95].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ej. 90,91; capítulos 16 de la ref. 95].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [por ej. 92].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ej. refs. 93 y 94; capítulo 21 de la ref. 95].
- un antígeno de difteria, tal como un toxoide de la difteria [por ej. capítulo 13 de la ref. 95].
- un antígeno del tétanos, tal como un toxoide tetánico [por ej. el capítulo 27 de la ref. 95].
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ej. capítulo 14 de la ref. 95].
- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ej. 73, 74, 75].
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ej. 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ej. 103].
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ej. 104].
- antígeno(s) de la polio [por ej. 105,106; capítulo 24 de la referencia 95] tales como IPV.

- antígeno(s) de la rabia [por ej. 107] tal como el virus inactivado liofilizado [por ej. 108, RabAvert™].
- antígenos del sarampión, paperas y/o rubéola [por ej. capítulos 19, 20 y 26 de la ref. 95].
- antígeno(s) de la gripe [por ej. los capítulos 17 y 18 de la ref. 95], tales como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ej. 109].
- un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ej. 67,110-112].

Cuando se usa un antígeno de sacárido o carbohidrato, este se conjuga preferentemente con un vehículo con el fin de potenciar la inmunogenicidad. La conjugación de los antígenos de sacárido de *H. influenzae* B, meningocócico y neumocócico es bien conocida.

Los antígenos proteicos tóxicos pueden ser destoxificados cuando sea necesario (por ej. destoxificación de la toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos [94]).

Cuando un antígeno de difteria está incluido en la composición se prefiere incluir también el antígeno del tétanos y los antígenos de pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos se prefiere incluir también antígenos de difteria y de pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de pertussis se prefiere también incluir antígenos de difteria y tétanos.

Los antígenos pueden ser adsorbidos a una sal de aluminio.

Los antígenos en la composición generalmente estarán presentes a una concentración de al menos 1µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno.

Como alternativa al uso de antígenos de proteína en la composición de la invención, se puede usar el ácido nucleico que codifica el antígeno [por ej. refs. 113 a 121]. Los componentes proteicos de las composiciones de la invención pueden por lo tanto ser sustituidos por ácido nucleico (preferentemente ADN por ej. en forma de un plásmido) que codifica la proteína.

En términos prácticos, puede haber un límite superior para el número de antígenos incluidos en las composiciones de la invención. El número de antígenos en una composición de la invención puede ser menos de 20, menos de 19, menos de 18, menos de 17, menos de 16, menos de 15, menos de 14, menos de 13, menos de 12, menos de 11, menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, menos de 5, menos de 4 o menos de 3.

Composiciones farmacéuticas y procedimientos

La invención proporciona procedimientos para preparar composiciones farmacéuticas, que comprenden las etapas de mezclar (a) un sacárido de la invención (opcionalmente en la forma de un conjugado) con (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una discusión detallada de dichos vehículos se encuentra disponible en la referencia 122.

Las composiciones de la invención pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La composición puede prepararse para administración tópica por ej. como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral por ej. como un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para la administración pulmonar por ej. como un inhalador, usando un polvo fino o una pulverización. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para la administración nasal, aural u ocular p. ej., en forma de gotas, como un aerosol o como un polvo [por ej. 123].

La composición farmacéutica es preferentemente estéril. Está preferentemente libre de pirógenos.

Está preferentemente tamponada, por ej. a un pH entre y 8, generalmente a un pH de alrededor de 7. La composición puede ser acuosa o puede estar liofilizada.

También se desvela un dispositivo de administración que contiene una composición farmacéutica de la invención. El dispositivo puede ser, por ejemplo, una jeringa o un inhalador.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente composiciones inmunogénicas, en el sentido de que comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de un inmunógeno de hidrato de carbono GAS. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (p. ej. primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse

mediante ensayos de rutina.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, se pueden tratar los sujetos humanos.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden utilizarse terapéuticamente (i.e. para tratar una infección existente) o profilácticamente (es decir para prevenir una futura infección).

Las composiciones farmacéuticas se pueden envasar en viales o en jeringas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una dosis única de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis única o dosis múltiples.

Las composiciones acuosas de sacáridos de la invención son adecuadas para la reconstitución de otras vacunas a partir de una forma liofilizada. Cuando una composición de la invención se va a usar para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un procedimiento para la reconstitución de dicha vacuna liofilizada, que comprende la etapa de mezclar el material liofilizado con una composición acuosa de la invención. El material reconstituido se puede utilizar para la inyección.

Generalidades

La expresión “que comprende” abarca “que incluye” así como “que consiste en” por ej. una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional por ej. X + Y.

El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, x ±1 0 %.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente” por ej. una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

Cuando la invención implica un procedimiento que implica múltiples etapas secuenciales, la invención también puede incluir un procedimiento que implica menos del total del número de etapas. Por ejemplo, si un sacárido ya se ha purificado parcialmente mediante la eliminación de ácidos nucleicos y/o proteínas contaminantes, entonces esta etapa se puede omitir de los procedimientos de la invención. Del mismo modo, una etapa de eliminación de contaminantes puede llevarse a cabo para dar un material listo para la cromatografía de intercambio aniónico. El material pre-tratado tiene utilidad como un intermedio en la preparación de sacárido y puede ser utilizado, almacenado, exportado etc. para su uso posterior por ej. para una posterior cromatografía de intercambio aniónico. Estas etapas se pueden realizar en momentos muy diferentes por diferentes personas en diferentes lugares (por ej. en diferentes países).

Se apreciará que los anillos de azúcar pueden existir en forma abierta y cerrada y que, aunque en el presente documento en las fórmulas estructurales se muestran las formas cerradas, las formas abiertas también están abarcadas por la invención. Del mismo modo, se apreciará que los azúcares pueden existir en formas piranosa y furanosa y que aunque en el presente documento en las fórmulas estructurales se muestran las formas piranosa, también están abarcadas las formas furanosa. También se incluyen las diferentes formas anoméricas de azúcares.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la estructura del hidrato de carbono GAS de *S. pyogenes*.

La Figura 2 compara la estructura del hidrato de carbono GAS de *S. pyogenes* con la del hidrato de carbono GAS de la variante de estreptococos del grupo A.

La Figura 3 muestra un espectro de RMN de ejemplo para el hidrato de carbono GAS.

La Figura 4 muestra un espectro de RMN de ejemplo para el hidrato de carbono GAS después de la filtración en gel.

La Figura 5 compara la contaminación con ácido hialurónico de preparaciones de hidrato de carbono GAS obtenidas mediante procedimientos cromatográficos de intercambio aniónico, intercambio catiónico y de interacción hidrófoba con la contaminación observada después de la ultrafiltración con una membrana de corte de solo 3 kDa.

La Figura 6 resume un procedimiento optimizado para la purificación del hidrato de carbono GAS.

La Figura 7 muestra un ejemplo de cromatograma del hidrato de carbono GAS purificado por cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose.

La Figura 8 muestra ejemplos de perfiles de HPLC-SE del hidrato de carbono GAS tras la concentración por filtración de flujo tangencial.

La Figura 9 muestra un espectro de RMN comentado para el hidrato de carbono GAS después de la filtración en gel.

La Figura 10 muestra un ejemplo de cromatograma para el hidrato de carbono GAS después de la filtración en gel.

La Figura 11 muestra cromatogramas de filtración en gel analíticos realizados en el hidrato de carbono GAS después de una 1) etapa de cromatografía aniónica y 2) una etapa de filtración de flujo tangencial de 10 kDa.

La Figura 12 muestra espectros de RMN de ^{1}H del hidrato de carbono GAS después de la filtración de flujo tangencial de 10 kDa; filtración de flujo tangencial de 10 kDa y filtración en gel y filtración en gel solo.

La Figura 13 ilustra un esquema de reacción para la obtención de un conjugado hidrato de carbono GAS-CRM_{197}.

La Figura 14 muestra el análisis en gel de SDS-PAGE de un conjugado hidrato de carbono GAS-CRM_{197}.

La Figura 15 muestra 1) gel de SDS-PAGE y 2) análisis SEC-HPLC de un conjugado hidrato de carbono GAS-CRM_{197} que comprende un enlazador.

Modos de llevar a cabo la invención

Ejemplo 1

Purificación del hidrato de carbono GAS de Streptococcus pyogenes

Después de cada etapa de purificación del hidrato de carbono GAS, la estructura se verificó por análisis de RMN (véase más adelante). En la Figura 3 se presenta un ejemplo de espectro de RMN del hidrato de carbono GAS.

Etapa 1: Extracción del hidrato de carbono GAS

Se inactivó con calor a 80 °C 4 l de cultivo de crecimiento bacteriano de *Streptococcus pyogenes* y se centrifugó a 300 g. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en tampón de solución salina y el hidrato de carbono GAS se liberó por tratamiento ácido reductor. En resumen, se añadieron 0,1 volúmenes de nitrito de sodio 4 N y 0,1 volúmenes de ácido acético glacial a la suspensión bacteriana con agitación hasta que la mezcla tenía un pH final o aproximado de 3,0. El pH se neutralizó a continuación hasta cerca de 6-7.

Etapa 2: Filtración y ultrafiltración

La mezcla se filtró usando un filtro de 0,6 µm (Sartopure GF2, Sartorius) y después se sometió a ultrafiltración usando una membrana de corte de 3 kDa (con un área de membrana de 0,1 m^2). La preparación se concentró hasta que tuvo un volumen de aproximadamente 200 ml y se dializó contra agua usando aproximadamente 10 volúmenes de agua. Se midió la contaminación de proteína de la preparación del hidrato de carbono GAS en esta etapa se midió y era de alrededor 20-30 %.

Etapas 3 y 4: Etapas cromatográficas

Las siguientes etapas cromatográficas se realizaron en un sistema AKTA™ (Farmacia). El hidrato de carbono GAS se detectó en las fracciones de eluyente mediante la medición de la absorción UV a 215 nm.

La preparación de hidrato de carbono GAS se trató por cromatografía de intercambio aniónico usando una resina Q Sepharose™ XL (GE Healthcare). El hidrato de carbono GAS se recoge del flujo continuo de la columna. Se usó 1 ml de resina se utilizó por cada 0,5 mg de hidrato de carbono GAS. El tampón de la fase móvil fue tampón de fosfato de sodio 10 mM suplementado con etanol 20 % en volumen. El hidrato de carbono GAS apareció en el flujo continuo, aunque como un solo pico. Se combinaron todas las fracciones que contienen el hidrato de carbono GAS. Se midió la contaminación con proteína de la preparación del hidrato de carbono GAS en esta fase y era de alrededor 5 %.

A continuación, la preparación del hidrato de carbono GAS se trató por filtración en gel utilizando un gel de Sephadex G50™ (GE Healthcare). Se usó 1 ml de gel por cada 0,2 mg de hidrato de carbono GAS. El volumen de preparación de hidrato de carbono GAS no se permitió que fuese superior al 5 % del volumen de la columna de filtración en gel. El tampón de la fase móvil fue tampón de fosfato de sodio 10 mM suplementado con etanol 20 % en volumen. El hidrato de carbono GAS apareció en el flujo continuo como dos picos: a) un gran pico de las especies de hidrato de carbono GAS de alto peso molecular y b) un pico pequeño de las especies de hidrato de carbono GAS de bajo peso molecular. El primer pico fue seleccionado para su uso en la preparación de vacunas. Se midió la contaminación con proteína de la preparación del hidrato de carbono GAS en esta etapa y era de alrededor 2-3 %. El rendimiento del hidrato de carbono GAS fue de 50-90 %.

En la Figura 4 se presenta un ejemplo de espectro de RMN del hidrato de carbono GAS después de la filtración en gel. La integración de los picos del espectro de RMN confirma que el hidrato de carbono GAS tiene la estructura correcta (Tabla I).

Tabla I

Muestra	**H_1^{RhaA} (integral=mol)***	**H_1^{RhaB} (integral=mol)***	**H_1^{GlcNAc} (integral=mol)***	**CH_3CONH^{GlcNAc} (integral - mol)****	**$CH3^{RhaA+RhaB}$ (integral - mol)*****
Muestra de fermentación (Lote 2911 + 2012)	**1,03**	**0,94**	**1,00**	3,31 - **1,10**	6,56 - **2,19**
Hidrato de carbono GAS después de la ultrafiltración (lote GCII)	**0,96**	**0,95**	**1,00**	2,96 - **0,99**	5,94 - **1,98**
Hidrato de carbono GAS después de la cromatografía de intercambio aniónico (lote GCII)	**1,18**	**0,96**	**1,00**	**3,06 - 1,02**	6,55 - **2,18**
Hidrato de carbono GAS después de la filtración en gel (lote GCIV)	**0,98**	**0,94**	**1,00**	3,13 - **1,04**	6,36 - **2,12**
* El valor integral corresponde a mol. ** El valor integral corresponde a 3x mol. *** El valor integral corresponde a 6x mol. El valor de referencia se fijó como H_1^{GlcNAc} o CH_3CONH^{GlcNAc} cuando el pico de H_1^{GlcNAc} no se detectaba debido a una superposición con la señal de HDO.					

ES 2 586 308 T3

Almacenamiento

La preparación del hidrato de carbono GAS se almacenó a -20 °C.

Comparación de la eficiencia de los diferentes procedimientos cromatográficos

Se comparó la eficiencia de los diferentes tipos de cromatografía en cuanto a la reducción de la contaminación de las preparaciones de hidrato de carbono GAS. Los tipos de procedimientos cromatográficos fueron filtración en gel (utilizando un gel de Sephadex™ G50); intercambio aniónico (usando una resina Q Sepharose™ XL); intercambio catiónico (utilizando una resina SP Sepharose™ XL) y de interacción hidrófoba (utilizando una resina de flujo rápido Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow). Todas las resinas y geles se obtuvieron de GE Healthcare. Se midió el rendimiento final del hidrato de carbono GAS (CHO) y la contaminación con proteína de la preparación del hidrato de carbono GAS obtenida de cada tipo de cromatografía (Tabla II).

Tabla II

Cromatografía/Tipo de resina	**Rendimiento de CHO, %**	**Contaminación con proteína final, % p/p**
Filtración en gel/Sephadex G50	70	3,1
Intercambio aniónico/Q Sepharose XL	77	2,3
Intercambio catiónico/SP Sepharose XL	nd*	3,7
Interacción hidrófoba/Phenyl Sepharose 6 Fast Flow	63	nd
* Nd - no determinado (interferencia)		

Estos datos muestran que la cromatografía de intercambio aniónico da como resultado un rendimiento más alto de hidrato de carbono GAS, en particular en comparación con la filtración en gel usada en la ref. 6. La cromatografía de intercambio aniónico también tiene como resultado una menor cantidad de contaminación con proteína de todos los procedimientos ensayados.

La contaminación con ácido hialurónico de las preparaciones de hidrato de carbono GAS obtenidas con los procedimientos cromatográficos de intercambio aniónico, intercambio catiónico e interacción hidrófoba se comparó con la contaminación observada después de la ultrafiltración con una membrana de solo 3 kDa 3 de corte (Figura 5). Estos datos muestran que la cromatografía de intercambio aniónico da como resultado la menor cantidad de contaminación con ácido hialurónico de todos los procedimientos probados.

Procedimientos analíticos

Medición de la concentración del hidrato de carbono GAS

La cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada se realizó usando el sistema DIONEX™. La preparación del hidrato de carbono GAS se hidrolizó en ácido trifluoroacético 4 M. Se usó una columna analítica CarboPac™ PA1 con NaOH 50 mM como tampón de la fase móvil. Se usó NaOH 500 mM para regenerar la columna. El tiempo de retención de la N-acetil-glucosamina y de la ramnosa fue 5,3 min y 7,2 min, respectivamente. Los picos de la ramnosa y la N-acetil-glucosamina se integraron y la cantidad de hidrato de carbono GAS se calculó en función de las curvas de calibración estándar.

Concentración de proteína

La contaminación con proteína se midió usando un ensayo MicroBCA (Pierce).

Concentración de ácido nucleico

La concentración de ácido nucleico se midió por absorbancia (A) a 260 nm. La concentración se cuantificó utilizando la ley de Lambert-Beer de $A = \varepsilon bc$, donde c es la concentración de la muestra; b es la longitud de la muestra (1 cm) y ε es 0,020 $(\mu g/ml)^{-1}cm^{-1}$ (el valor de la literatura para la doble hélice de ADN). Una solución de polisacárido a 1 mg/ml en agua o tampón se leyó en un espectrofotómetro (espectrofotómetro Lambda 25 de Perkin Elmer) en una cubeta de cuarzo, ajustando el instrumento con la correspondiente agua o tampón. La concentración del ácido nucleico se calculó como $c = A/\varepsilon b$. A partir de este valor, se calculó el % de contaminación con ácido nucleico dividiendo la concentración de ácido nucleico por la concentración de polisacárido y multiplicando el resultado por 100.

Análisis de RMN.

Las muestras (~ 1 mg de polisacárido) se prepararon mediante secado por congelación para eliminar el disolvente H_2O protonado. Después, el producto se disolvió en óxido de deuterio (D_2O, átomo de D 99,9 %, de Aldrich) para

producir una solución uniforme. Los inventores han encontrado que el secado por congelación no afecta a la estructura físico-química de la fracción de sacárido. Los experimentos de RMN de 1^H se registraron a 25 °C en un espectrómetro a 600 MHz Bruker Avance™ utilizando una sonda de banda ancha de 5 mm (Bruker). Se utilizó el paquete de software XWINNMR™ (Bruker) para la adquisición y procesamiento de los datos. Se recogieron 32k de puntos de datos en una anchura espectral de 10 ppm para los espectros de protones. El transmisor se fijó en la frecuencia HDO, que también se utilizó como señal de referencia (4,79 ppm).

Los espectros de RMN de protón 1-D se recogieron usando un experimento de un pulso estándar.

Estimación del contenido residual de ácido hialurónico (HA).

El contenido residual de ácido hialurónico se estimó mediante un kit comercial de Corgenix Inc. (Número de producto 029-001). Este kit de prueba de HA es un ensayo de unión a proteínas ligado a enzimas que utiliza una molécula de captura conocida como proteína de unión de ácido hialurónico (HABP). Las soluciones de suero o plasma y de referencia de HA adecuadamente diluidas se incuban en micropocillos recubiertos con HABP, permitiendo que el HA presente en las muestras reaccione con la proteína de unión inmovilizada (HABP). Después de la eliminación de las moléculas de la muestra no unidas por lavado, se añade a los pocillos una solución de HABP conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para formar complejos con HA unido. Después de otra etapa de lavado, se añade un sustrato cromogénico de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno para efectuar un cambio de color en la mezcla de reacción. La intensidad del color se mide por unidades de densidad óptica (DO) con un espectrofotómetro a 450 nm. Los niveles de HA en muestras desconocidas y de control se determinan frente a una curva de referencia preparada a partir del blanco reactivo (0 ng/ml) y las soluciones de referencia de HA proporcionado con el kit (50, 100, 200, 500, 800 ng/ml).

Ejemplo 2

Optimización de la purificación del hidrato de carbono GAS de Streptococcus pyogenes

El hidrato de carbono GAS obtenido después del cultivo es generalmente impuro y está contaminado con ácido hialurónico, proteínas, poli-ramnosa y ácidos nucleicos. El procedimiento de purificación del Ejemplo 1, basado en la filtración de flujo tangencial, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel), ha sido optimizado con el fin de facilitar la escalabilidad y mejorar la pureza.

El procedimiento de purificación optimizado (resumido en la Figura 6) elimina el ácido hialurónico, reduce la contaminación con poli-ramnosa hasta <20 % y reduce la contaminación con proteína residual hasta <4 %. Las etapas secuenciales de este procedimiento se describen con más detalle a continuación.

Filtración ortogonal de 0,65 µm

Esta primera etapa de purificación elimina la contaminación con partículas usando la filtración ortogonal de 0,65 µm. Antes de la filtración, el pH de la suspensión del hidrato de carbono GAS obtenida después del tratamiento con nitrato de sodio y ácido acético glacial se neutralizó hasta alrededor de 6-7. Después, la mezcla se filtró usando una cápsula Sartopure GF2™ de 0,65 µm (Sartorius). Para una suspensión de aproximadamente 2 l obtenida a partir de una fermentación de 5 L, se utiliza generalmente una superficie de filtración de 0,2 m^2, completándose la operación en aproximadamente 30-40 minutos.

La Tabla III muestra ejemplos de concentraciones de hidrato de carbono GAS para el filtrado de esta etapa.

Tabla III

Muestra	GlcNAc mg/ml	GlcNAc mgTOT
9A	0,281	1011,6
10	0,324	1036,48
12	0,239	812,6

Filtración de flujo tangencial de 30 kDa

La segunda etapa es la filtración de flujo tangencial para eliminar las especies de bajo peso molecular (p. ej. proteína, ácido nucleico y ácido hialurónico). Se han comparado diferentes membranas de corte con el fin de mejorar la purificación y reducir el tiempo de procesamiento.

Para procesar el material de una fermentación de 5 l se usaron membranas Hydrosart ™ de 3kDa, 5 kDa, 10 kDa y 30 kDa de corte (Sartorius) con áreas de membrana de 0,1 m^2. La solución de polisacárido bruto se concentró aproximadamente 15-20 veces y se dializó primero contra aproximadamente 10 volúmenes de NaCl 1 M y posteriormente contra agua usando aproximadamente 10 volúmenes. La etapa de filtración de flujo tangencial se realizó utilizando un soporte para casetes (Sartorius) de 0,1 m^2 con una bomba peristáltica (WatsonMarlon). Las

condiciones de presión utilizadas fueron P*in* = 1,0 bar y P*out* = 0,4 bar, con el flujo del permeado, en función de la membrana de corte, que se varió de 18 a 100 ml/min como sigue:

3k Da, flujo = 18 ml/min
5k Da, flujo = 40 ml/min
10k Da, flujo = 50 ml/min
30k Da, flujo = 80 a 100 ml/min

Se encontró que la membrana de corte de 30 kDa proporcionaba una mejor reducción de la contaminación con proteína y tiempo de filtración, sin pérdida sustancial de hidrato de carbono GAS de la fracción retenida (Tabla IV).

Tabla IV

Membranas de corte	Contenido de proteína (%)	Recuperación de hidrato de carbono (%)
3k Da	25 %	95-100 %
5k Da	20 %	95-100 %
10k Da	8-11 %	95-100 %
30k Da	4-5 %	90 %

Cromatografía de Q-Sepharose

La etapa de cromatografía de intercambio aniónico es particularmente eficaz para reducir la contaminación con ácido hialurónico del hidrato de carbono GAS, así como con proteína y ácido nucleico.

La etapa se llevó a cabo utilizando un sistema Akta™ (G&E Healthcare), detectándose el carbohidrato GAS por absorción UV a 215 nm. El retenido de la etapa de ultrafiltración se añadió con tampón NaPi 100 mM a pH 7,2 con el fin de obtener una concentración de tampón final de NaPi 10 mM pH 7,2. A continuación, esta preparación de hidrato de carbono GAS se procesó por cromatografía de intercambio aniónico usando una resina Q Sepharose™ XL (G&E Healthcare) equilibrada en tampón NaPi 10 mM a pH 7,2. Por lo general, se utilizó 1 ml de resina por 1 mg de hidrato de carbono GAS. La cromatografía de intercambio aniónico puede configurarse para permitir el “flujo continuo” del hidrato de carbono GAS en el que las impurezas se unen a la matriz de intercambio aniónico.

El hidrato de carbono GAS se recogió en fracciones del flujo continuo de la columna, apareciendo principalmente como un solo pico (Figura 7). Las fracciones se combinaron (a excepción de las de la cola del pico mostradas en la Figura 7).

En la Tabla V se muestra el % de recuperación de polisacárido, el contenido de proteína y el contenido de ácido hialurónico de ejemplos de fracciones combinadas en esta etapa del procedimiento.

Tabla V

Muestra	Recuperación de polisacárido (rendimiento de la etapa %)	Contenido de proteína (%)	Contenido de ácido hialurónico (%)	Ácido nucleico (%)
12	50 %	3,5 %	<1 %(-)	0,4 %
17A	67 %	1,3 %	<1 % (<0,005 %)	0,5 %
17B	64 %	3,5 %	<1 % (-)	0,3 %
19	44 %	2,8 %	<1 % (<0,005 %)	0,2 %
20	53 %	2,2 %	<1 % (0,005 %)	0,8 %

En un procedimiento alternativo, la preparación del hidrato de carbono GAS se procesó por cromatografía de intercambio aniónico usando una resina Q Sepharose™ FF (G&E Healthcare) pre-equilibrada en tampón NaPi 100 mM a pH 7,2 hasta que se alcanzó un pH de 7,2 y después se equilibró en tampón NaPi 10 mM a pH 7,2 hasta alcanzar una conductividad de 1,8-2,0 mS/cm. La cromatografía se llevó a cabo de acuerdo con la Tabla VI:

Tabla VI

Resina	Resina Q Sepharose™ Fast Flow (G&E Healthcare)
Polisacárido/resina	1 mg/ml
Dimensión de la columna de aproximadamente 500 mg de polisacárido	Ø = 5 cm; h = 27 cm; V = 530 ml

(continuación)

Pre-equilibración	tampón NaPi 100 mM pH 7,2 hasta alcanzar pH 7,2 en el eluato
Equilibrio	tampón NaPi 10 mM pH 7,2 hasta alcanzar 1,8-2,0 mS/cm de conductividad del eluato
Recogida de producto	fracciones de 10 ml combinadas de acuerdo con el pico de flujo continuo

Filtración de flujo tangencial 10 kDa o 5 kDa

La etapa de filtración de flujo tangencial tiene como resultado la concentración de la solución de hidrato de carbono GAS. Esto permite optimizar la concentración del hidrato de carbono GAS que se ha de optimizar para la conjugación posterior.

Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una fermentación de 5 l, la etapa de filtración de flujo tangencial se lleva a cabo usando un sistema Tandem mod. 1082™ con una membrana Hydrosart™ de 10 kDa de corte con un área de membrana de 200 cm^2 (ambos de Sartorius). Las condiciones de presión eran P*in* = 0,5 bar y P*out* = 0,0 bar, con el flujo fijado en 4-5 ml/min. La filtración se continuó hasta que se alcanzó la concentración deseada de hidrato de carbono GAS. La diafiltración después de esta etapa de concentración se omitió ya que esto puede conducir a la pérdida de hidrato de carbono GAS en el permeado.

Como alternativa, la etapa de filtración de flujo tangencial se lleva a cabo utilizando una membrana Hydrosart™ de 5 kDa de corte con un área de membrana de 200 cm^2 (Sartorius). Las condiciones de presión fueron P*in* = 0,7 bar y P*out* = 0,0 bar, con el flujo fijado en 2 ml/min.

Se encontró que la recuperación final del hidrato de carbono GAS purificado después de la etapa de concentración era de aproximadamente 300 mg de la fermentación inicial de 5 l.

En la Tabla VII se muestra el % de recuperación de polisacárido y el contenido proteína, poli-ramnosa, ácido hialurónico y ácido nucleico de muestras de ejemplo en esta etapa del procedimiento. En la Figura 8 se muestran los perfiles de HPLC-SE del hidrato de carbono GAS purificado.

Tabla VII

Muestra	**FFT**	**Recuperación de polisacárido (rendimiento de la etapa %)**	**Contenido de proteína (%)**	**Contenido de poli-ramnosa (%)**	**Contenido de ácido hialurónico (%)**	**Ácido nucleico**
14	10 kDa	68 %	2,1 %	18 %	<1 %	<1 %
					(<0,005 %)	(0,3 %)
17A	10 kDa	95 %	2,1 %	16 %	<1 %	<1 %
					(<0,005 %)	(0,4 %)
19	5 kDa	90 %	2,8 %	4 %	<1 %	<1 %
					(<0,005 %)	(0,2 %)
20	5 kDa	80 %	2,2 %	4,5 %	<1 %	<1 %
					(<0,005 %)	(0,3 %)

Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el contenido de proteína (tal como se mide por el ensayo MicroBCA (Pearce)) puede ser artificialmente alta debido a la interferencia causada por la presencia de especies de ramnosa en la muestra de hidrato de carbono GAS. Cuando se mide por gel de SDS-PAGE (NuPAGE™ 7% Tris-Acetate Gel, Invitrogen) en condiciones reductoras y no reductoras con un exceso de muestra de hidrato de carbono GAS (630 µg, lo que implica aproximadamente 12,6 µg si el nivel de contaminación con proteína es 2 %), no se detecta este alto nivel de proteína.

Procedimientos analíticos

Estimación del contenido residual de poli-ramnosa residual.

En base a la asignación del pico de RMN (Figura 9), se estimó el contenido residual de poli-ramnosa mediante la relación integral:

$$\% \text{ poli-ramnosa} = [H_1{}^{RhaB}{}_{VAR}/(H_1{}^{RhaA} + H_1{}^{RhaA}{}_{VAR})] \times 100$$

Ejemplo 3

Comparación entre las etapas de filtración de flujo tangencial 10 kDa o 5 kDa y la filtración en gel

En el Ejemplo 1, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico fue seguida por una etapa de filtración en gel con el fin de reducir aún más la contaminación. Por el contrario, el procedimiento optimizado del Ejemplo 2 implica la filtración de flujo tangencial (5 kDa o 10 kDa) en lugar de la filtración en gel en esta etapa del procedimiento. Las dos alternativas dan como resultado más o menos el mismo nivel de recuperación de hidrato de carbono GAS. Sin embargo, la filtración de flujo tangencial parece dar como resultado niveles más bajos de contaminación con poli-ramnosa (medido por RMN de ^{1}H).

Etapa de filtración en gel

La cromatografía se realizó en un sistema Akta™ (G&E Healthcare), llevándose a cabo la filtración en gel con un gel de Sephacryl S100 (G&E Healthcare). El volumen de preparación del hidrato de carbono GAS no se permitió superar el 5 % del volumen de la columna de filtración en gel. El tampón de la fase móvil fue tampón NaPi 10 mM a pH 7,2.

El polisacárido apareció en el flujo continuo, aunque como dos picos: a) un pico grande de hidrato de carbono GAS y b) un pico pequeño de poli-ramnosa (Figura 10). La cantidad de poli-ramnosa era bastante alta, aproximadamente 40-50 % de la muestra total de polisacárido.

Etapa de filtración de flujo tangencial

Por el contrario, la pureza del hidrato de carbono GAS obtenido con el procedimiento optimizado es mayor.

La Figura 11 muestra cromatogramas de filtración en gel analíticos de la muestra de hidrato de carbono GAS después de 1) la etapa de cromatografía aniónica del procedimiento optimizado y 2) la etapa de filtración de flujo tangencial de 10 kDa de este procedimiento, que tiene lugar después de la cromatografía aniónica.

El material obtenido a partir de éstas y otras filtraciones en gel se comparó por RMN de ^{1}H con el fin de medir el nivel de contaminación con poli-ramnosa. La Figura 12 muestra los espectros de las muestras obtenidas después de 1) la etapa de filtración de flujo tangencial de 10 kDa del procedimiento optimizado; 2) la etapa de filtración de flujo tangencial de 10 kDa del procedimiento optimizado seguida de una etapa adicional de filtración en gel y 3) una versión modificada del procedimiento optimizado en el que la etapa de filtración de flujo tangencial de 10 kDa se sustituye por una etapa de filtración en gel. Los espectros son muy similares, lo que demuestra que las etapas de filtración de flujo tangencial de 30 kDa y de cromatografía aniónica son suficientes para la purificación del hidrato de carbono GAS con una baja contaminación de poli-ramnosa (<20 %). No se requiere la etapa de filtración en gel, aunque la etapa de concentración realizada con filtración de flujo tangencial de 10 kDa o 5 kDa es simplemente conveniente para el posterior procesamiento del hidrato de carbono GAS, por ejemplo para la conjugación con una molécula vehículo.

Ejemplo 4

Preparación de conjugado

Reacción de aminación reductora directa

El hidrato de carbono GAS purificado se conjugó con la proteína vehículo CRM_{197} mediante una reacción de aminación reductora directa (Figura 13). La reacción de aminación reductora implica un grupo amina en la cadena lateral de una lisina en la proteína vehículo y un grupo aldehído en el sacárido, específicamente en el extremo reductor del polisacárido del hidrato de carbono GAS.

Antes de la conjugación, el hidrato de carbono GAS purificado se secó en un sistema rotavapor. A continuación, el hidrato de carbono GAS seco se disolvió en tampón NaPi 200 mM pH 8,0 con el fin de tener una concentración final de 10 mg/ml. La proteína vehículo, CRM_{197} se añadió a la solución de hidrato de carbono GAS en tampón NaPi 200 mM a pH 8,0 y $NaBH_3CN$ (Aldrich). La relación polisacárido: proteína era 4:1 (peso/peso) y la relación polisacárido:$NaBCNH_3$ era de 2:1 (peso/peso). Después de la reacción, la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se mantuvo a 37 °C durante 2 días.

Después de estos 2 días, se realizó el análisis en gel SDS-PAGE (NuPAGET™ 7% Tris-Acetate Gel (Invitrogen)) para verificar la formación del conjugado covalente. Los resultados se muestran en la Figura 14.

Reacción de conjugación alternativa

El hidrato de carbono GAS también se puede conjugar con una molécula vehículo a través de un enlazador. El hidrato de carbono GAS purificado se conjugó con la proteína vehículo CRM_{197} a través de un enlazador de ácido

adípico.

En una primera etapa, se llevó a cabo la aminación reductora del grupo aldehído en el extremo reductor del polisacárido del hidrato de carbono GAS. El hidrato de carbono GAS purificado se disolvió en agua a una concentración final de 4 mg/ml. Se añadió $AcONH_4$ a una concentración de 300 g/l y se añadió $NaBH_3CN$ en una relación molar 1: 5 con el $CONH_4$. La mezcla se mezcló y el pH de la mezcla se controló en alrededor de 7,0-7,5. La mezcla se mantuvo a 37 °C durante 60 h. Finalmente, la mezcla de reacción se purificó con filtración de flujo tangencial de 10 kDa, diálisis contra NaCl 0,1 M usando aproximadamente 10 volúmenes y luego contra agua usando aproximadamente 10 volúmenes.

En una segunda etapa, el carbohidrato GAS aminado se activó con el enlazador. El hidrato de carbono GAS aminado se concentró primero utilizando un sistema rotavapor (Büchi) y después se disolvió en agua hasta una concentración de 40 µmol/ml de grupos amino/ml. El DMSO se añadió en una cantidad igual a 9 veces la cantidad de agua en la mezcla, añadiéndose Et_3N en una proporción de 10:1 con los grupos amino. Finalmente, se añadió SIDEA (diéster succínico de ácido adípico) a una relación molar de 12:1 molar con los grupos amino. La mezcla se mezcló a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió gota a gota a la mezcla AcOEt (80 % del volumen de reacción final) y NaCl 1 M (1,5 % del volumen final de reacción) y la solución se mantuvo en hielo durante 1 h, tiempo durante el cual el hidrato de carbono GAS activado precipita en forma de un sólido blanco. Después, la suspensión se centrifugó a 4000 rpm (1780xg) durante 15 min y el precipitado sedimentado se lavó cinco veces con AcOEt en una cantidad igual a un tercio del volumen de precipitación (el volumen inicial de AcOEt utilizado para precipitar el hidrato de carbono GAS). Cada lavado consistió en mezclar durante 5 min y después centrifugar a 4000 rpm durante otros 5 min. Después del lavado, el precipitado se secó durante una noche.

En una etapa final final, el hidrato de carbono GAS activado se conjugó con la proteína CRM_{197}. Esta reacción se llevó a cabo usando una relación de conjugación de 20:1 entre los moles de grupo éster activo en el hidrato de carbono GAS activado y los moles de CRM_{197}. CRM_{197} se diluyó a una concentración final de 20 mg/ml usando tampón NaPi 100 mM a pH 7,2. Posteriormente, el polvo de hidrato de carbono GAS activado se añadió gradualmente a una solución de proteína con agitación suave. Después, la mezcla de reacción se mantuvo con agitación suave a temperatura ambiente durante 3 h.

El análisis en gel SDS-PAGE (NuPAGE™ 7% Tris-Acetate Gel (Invitrogen)) se realizó para verificar la formación de conjugado covalente. También se llevó a cabo el análisis SEC-HPLC. Los resultados se muestran en la Figura 15. Los análisis de gel SDS-PAGE y SEC-HPLC no sugirieron ninguna diferencia significativa entre el conjugado que comprende un enlazador y el conjugado obtenido mediante aminación reductora directa.

Ejemplo 5

Estudios en ratones

El efecto del hidrato de carbono GAS purificado conjugado con CRM_{197} a través de la reacción de aminación reductora directa fue probado en un ensayo de provocación con GAS intraperitoneal. Los ratones fueron inmunizados con el conjugado (a una dosis de 10 g de sacárido) por administración intraperitoneal con un adyuvante de alúmina. Tras la provocación con la cepa M1 de *Streptococcus pyogenes*, el 51 % de los ratones sobrevivieron en comparación con el 16 % de los controles no inmunizados. En otro estudio, los ratones fueron provocados con las cepas M1 o M23. En este estudio, el 56 % de los ratones inmunizados provocados con la cepa M1 sobrevivió en comparación con el 20 % de los controles no inmunizados, mientras que el 41 % de los ratones provocados con la cepa M23 sobrevivió comparado con el 11 % en los controles. Por consiguiente, el hidrato de carbono GAS purificado por el procedimiento de la invención proporciona inmunidad protectora.

Referencias

[1] Bisno et al. (2005) Clin Infect Dis. 41(8):1150-6.
[2] Cohen-Poradosu and Kasper (2007) Clin Infect Dis. 45(7):863-5.
[3] World Health Organization. Dept. of Child and Adolescent Health and Development (2005) Group A streptococcal vaccine development: current status and issues of relevance to less developed countries (WHO/FCH/CAH/05.09; WHO/IVB/05.14)
[4] McCarty (1958) J Exp Med. 108(3):311-23.
[5] Dubois et al. (1956) Anal. Chem. 28:350-356.
[6] Patente US-5.866.135.
[7] Pancholi and Fischetti (1988) J Bacteriol. 170(6):2618-24.
[8] Sabharwal et al. (2006) J Infect Dis. 193(1):129-35.
[9] Sabharwal et al. (2006) International Congress Series 1289:329-331.
[10] Michon et al. (2005) Infect Immun. 73(10):6383-9.
[11] Fillit et al. (1986) JExp Med.164(3):762-76.
[12] Cunningham in Gram-Positive Pathogens, Eds. Fischetti et al., ASM Press, Washington D.C. (2006) ISBN: 9781555813437.
[13] Martins et al. (2008) Int Immunol. 20(3):445-52.

[14] Kreis et al. (1995) Int JBiol Macromol. 17(3-4):117-30.
[15] Höög et al.(2002) Carbohydr Res. 337(21-23):2023-36
[16] www.polymer.de
[17] Park and Johnson (1949) J. Biol. Chem. 282, 149-151.
[18] Wessels et al. (1989) Infect Immun 57:1089-94.
[19] Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251):195-196.
[20] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.
[21] Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-68.
[22] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-33, vii.
[23] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-7.
[24] Patente europea 0477508.
[25] Patente US-5.306.492.
[26] WO98/42721.
[27] Dick et al. in Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
[28] Hermanson Bioconjugae Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
[29] Jennings and Lugowski (1981) J Immunol. 127(3):1011-8.
[30] Patente US-4.882.317
[31] Patente US-4.695.624
[32] EP-B-0 477 508
[33] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
[34] EP-A-0208375
[35] Bethell G.S. et al., J. Biol Chem., 1979, 254, 2572-4
[36] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18
[37] WO00/10599
[38] Gever et al., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
[39] Patente US-4.057.685.
[40] Patentes US-673,574; US-4,761,283; US-4,808,700.
[41] Patente US-4.459.286.
[42] Patente US-5.204.098
[43] Patente US-4.965.338
[44] Patente US-4.663.160.
[45] WO2007/000343.
[46] WO 2006/082530.
[47] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
[48] EP-A-0372501.
[49] EP-A-0378881.
[50] EP-A-0427347.
[51] WO93/17712
[52] WO94/03208.
[53] WO98/58668.
[54] EP-A-0471177.
[55] WO91/01146
[56] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
[57] Baraldo et al. (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.
[58] EP-A-0594610.
[59] Ruan et al. (1990) J Immunol 145:3379-3384.
[60] WO00/56360.
[61] Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
[62] Michon et al. (1998) Vaccine. 16:1732-41.
[63] WO02/091998.
[64] WO01/72337
[65] WO00/61761.
[66] WO00/33882
[67] WO02/34771.
[68] WO99/42130.
[69] WO2004/011027.
[70] WO96/40242.
[71] Lei et al. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264.
[72] WO00/38711; US patent 6,146,902.
[73] WO99/24578.
[74] WO99/36544.
[75] WO99/57280.
[76] WO00/22430.
[77] Tettelin et al (2000) Science 287:1809-1815.
[78] WO96/29412.
[79] Pizza et al. (2000) Science 287:1816-1820.

[80] WO01/52885.
[81] Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
[82] Fukasawa et al. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
[83] Rosenqvist et al. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333.
[84] Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-698.
[85] WO03/007985.
[86] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
[87] Rubin (2000) Pediatr Clin Worth Am 47:269-285, v.
[88] Jedrzejas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
[89] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
[90] Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
[91] Gerlich et al. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
[92] Hsu et al. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915.
[93] Gustafsson et al. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
[94] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238.
[95] Vaccines (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
[96] WO02/02606.
[97] Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
[98] Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
[99] Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3):S524-S527.
[100] WO99/27105.
[101] WO00/27994.
[102] WO00/37494.
[103] WO99/28475.
[104] Ross et al. (2001) Vaccine 19:4135-4142.
[105] Sutter et al. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
[106] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.
[107] Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl:S2-6.
[108] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
[109] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-107.
[110] WO03/093306.
[111] WO2004/018646.
[112] WO2004/041157.
[113] Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunology 9:271-283.
[114] Donnelly et al. (1997) Annu Rev Immunol 15:617-648.
[115] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) Expert Opin Investig Drugs 9:471-480.
[116] Apostolopoulos & Plebanski (2000) Curr Opin Mol Ther 2:441-447.
[117] Ilan (1999) Curr Opin Mol Ther 1:116-120.
[118] Dubensky et al. (2000) Mol Med 6:723-732.
[119] Robinson & Pertmer (2000) Adv Virus Res 55:1-74.
[120] Donnelly et al. (2000) Am J Respir Crit Care Med 162(4 Pt 2): S190-193.
[121] Davis (1999) Mt. Sinai J. Med. 66:84-90.
[122] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
[123] Almeida & Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica que comprende las etapas de mezclar un hidrato de carbono de *Streptococcus* del grupo A (GAS) con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el hidrato de carbono GAS se purifica en un procedimiento que comprende una etapa de cromatografía de intercambio aniónico.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el hidrato de carbono GAS purificado tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el sacárido está parcial o totalmente N-desacetilado.

4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el material de partida es una suspensión acuosa del hidrato de carbono GAS, que comprende además ácido hialurónico y/o poli-ramnosa, en el que, opcionalmente, la suspensión se prepara tratando *Streptococcus pyogenes,* de tal manera que el hidrato de carbono GAS se libera por tratamiento con ácido reductor.

5. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento comprende una o más etapas de filtración antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, en el que, opcionalmente, la filtración es por filtración ortogonal utilizando un filtro de 0,65 µm.

6. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento comprende una o más etapas de ultrafiltración antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, en el que, opcionalmente, la ultrafiltración es por filtración de flujo tangencial usando una membrana de corte de 30 kDa.

7. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que

(a) la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo usando una resina Q como matriz de intercambio aniónico y/o
(b) la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo utilizando 1 ml de resina de matriz de intercambio aniónico por cada 1 mg de hidrato de carbono GAS y/o
(c) la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se realiza en condiciones que permiten el flujo continuo del hidrato de carbono GAS.

8. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el tampón de la fase móvil para la cromatografía de intercambio aniónico comprende alcohol, en el que opcionalmente la concentración final de alcohol en el tampón de la fase móvil está entre 15 % y 25 % y en el que opcionalmente el alcohol es etanol.

9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento comprende una o más etapas de filtración en gel después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, en el que opcionalmente la etapa(o etapas) de filtración en gel se lleva a cabo utilizando un gel de dextrano como matriz de filtración en gel, y en el que opcionalmente la etapa(o etapas) de filtración en gel se lleva a cabo utilizando 1 ml de matriz de filtración en gel por cada 0,2 mg de hidrato de carbono GAS.

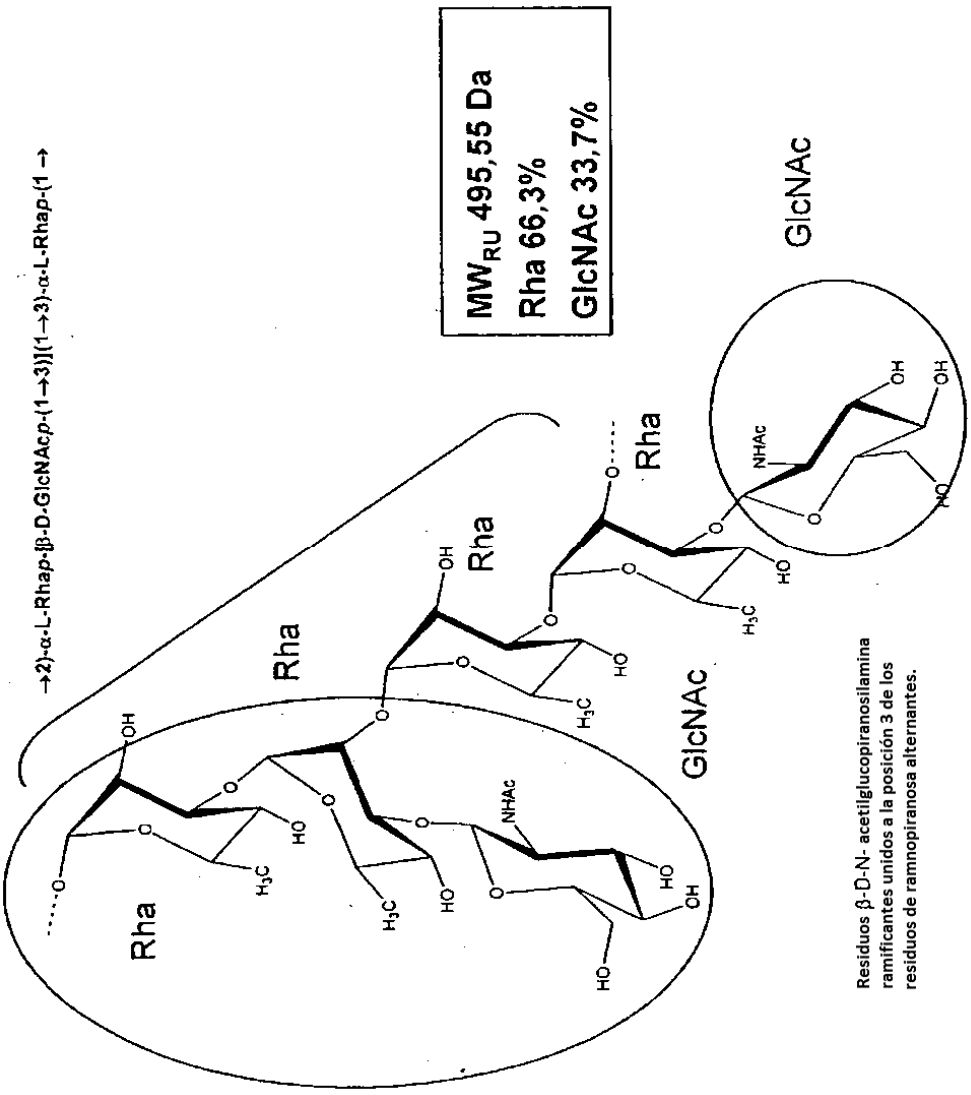
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que

(a) la etapa(o etapas) de filtración en gel se realiza utilizando el mismo tampón de la fase móvil que en la etapa de cromatografía de intercambio aniónico y/o
(b) la etapa(o etapas) de filtración en gel se realiza usando un tampón de la fase móvil como se define en la reivindicación 8.

11. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento comprende una o más etapas de concentración del hidrato de carbono GAS después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, en el que opcionalmente la etapa(o etapas) de concentración se lleva a cabo por filtración de flujo tangencial usando una membrana de corte de 5 kDa o 10 kDa.

12. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento incluye una etapa adicional de conjugar el hidrato de carbono GAS purificado con una molécula vehículo.

FIGURA 1


Cadena principal de poli- α -L-ramnopiranosil con enlaces glicosídicos alternantes (1→2) y (1→3)
→2)-α-L-Rhap-β-D-GlcNAcp-(1→3)](1→3)-α-L-Rhap-(1 →
MW$_{RU}$ 495,55 Da
Rha 66,3%
GlcNAc 33,7%
Rha
Rha
Rha
GlcNAc
GlcNAc
Residuos β-D-N- acetilglucopiranosilamina ramificantes unidos a la posición 3 de los residuos de ramnopiranosa alternantes.

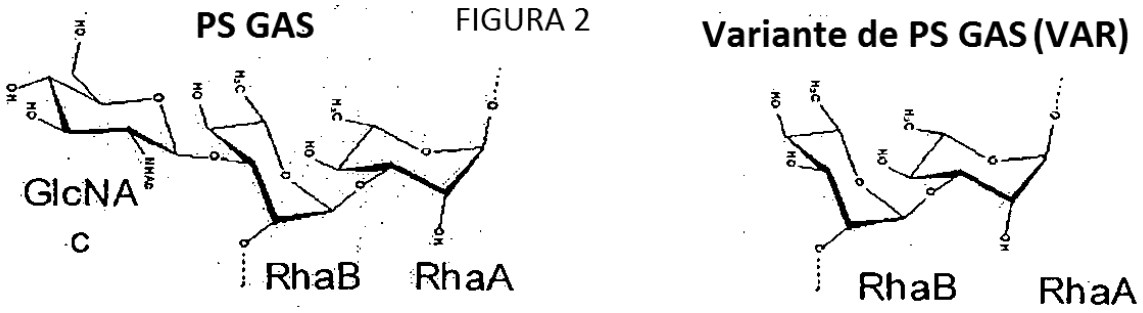
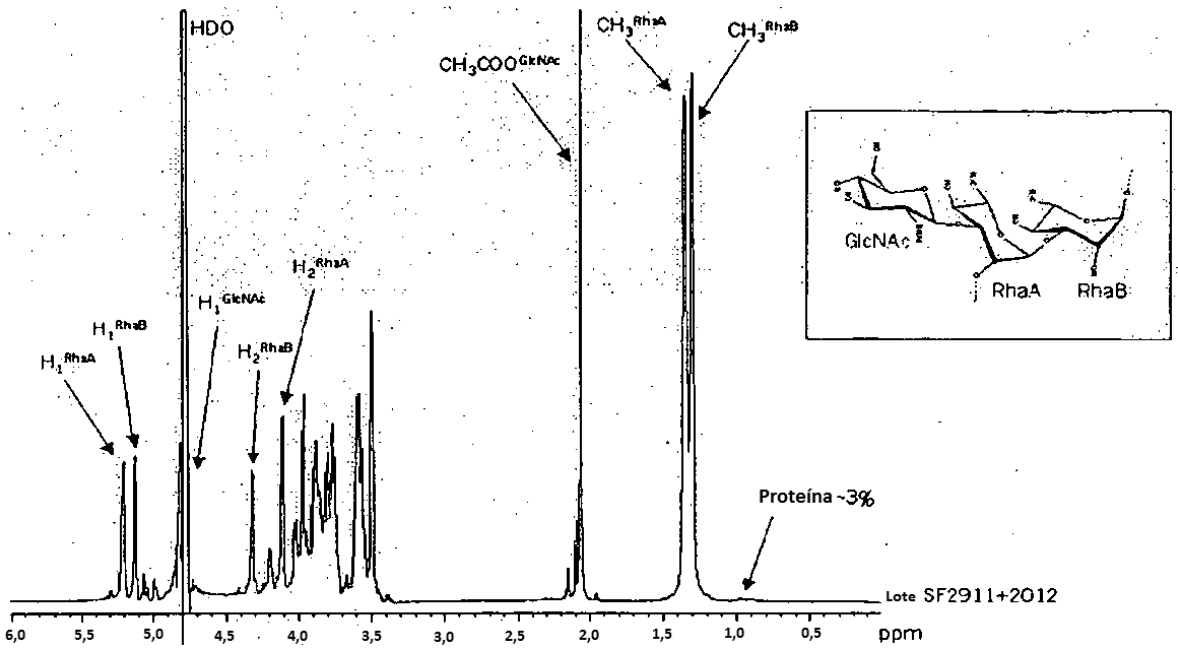


FIGURA 2

FIGURA 3



Ampliación de la región 5,4-3,4 ppm:

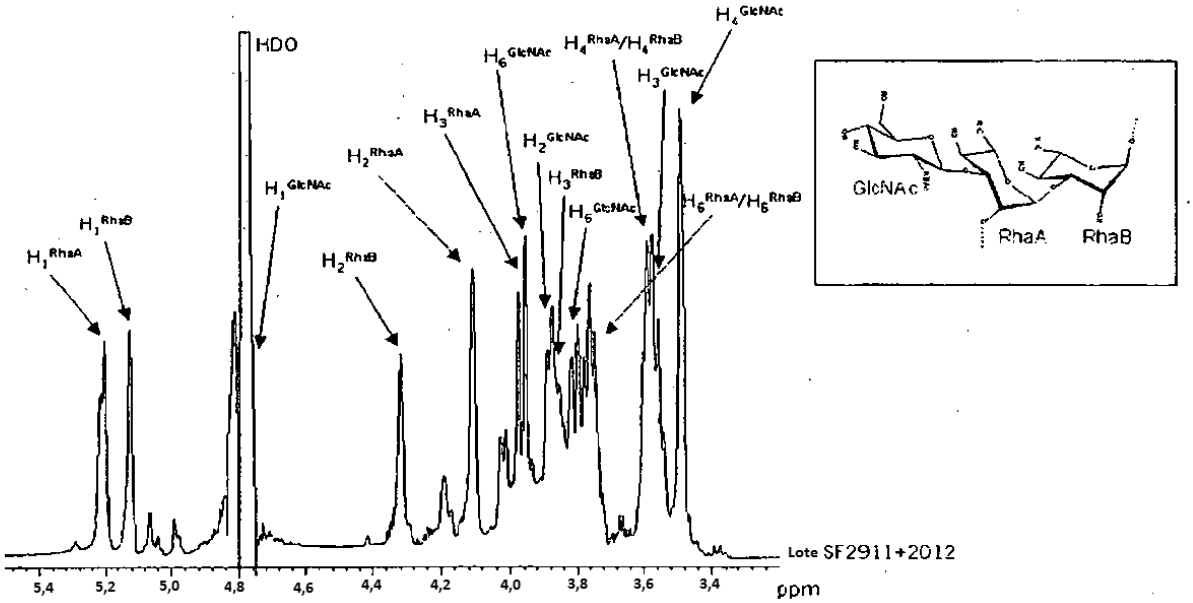


FIGURA 4

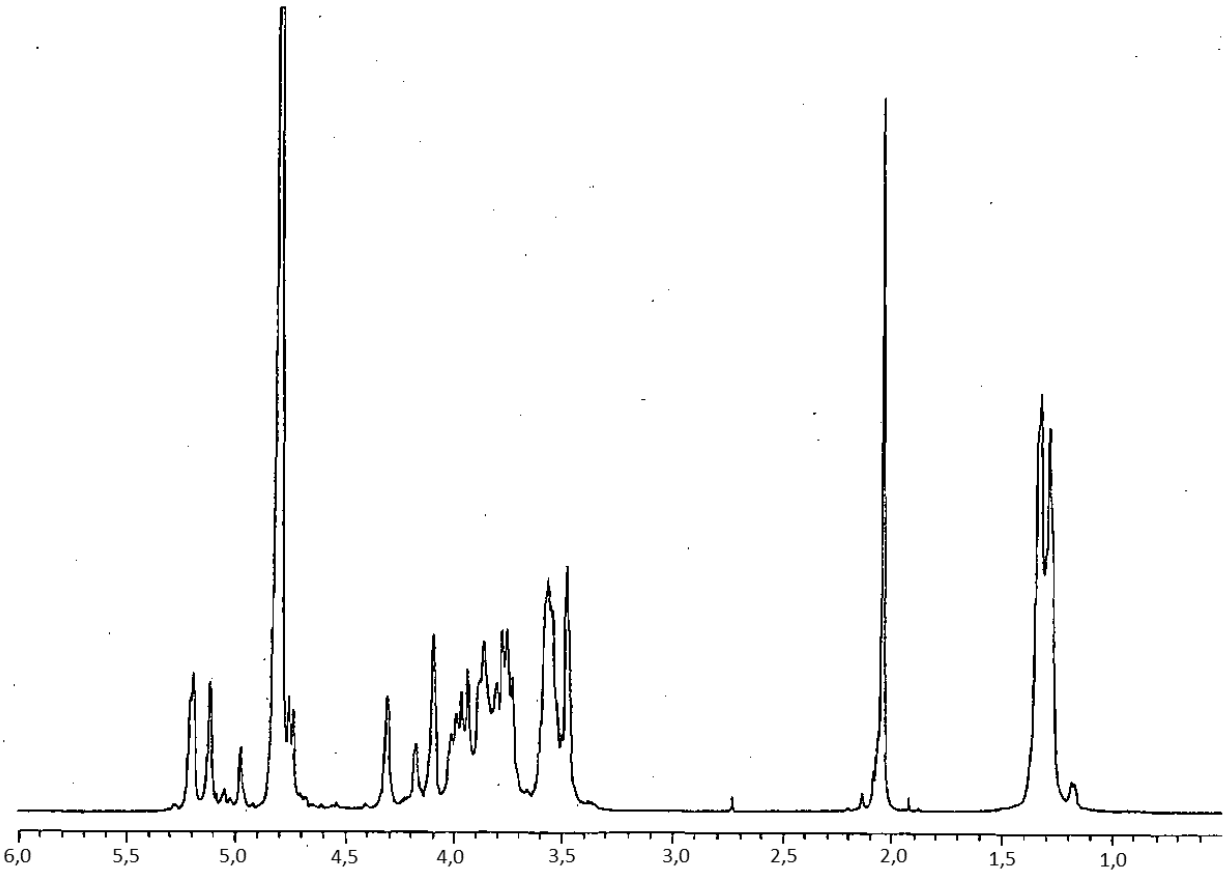
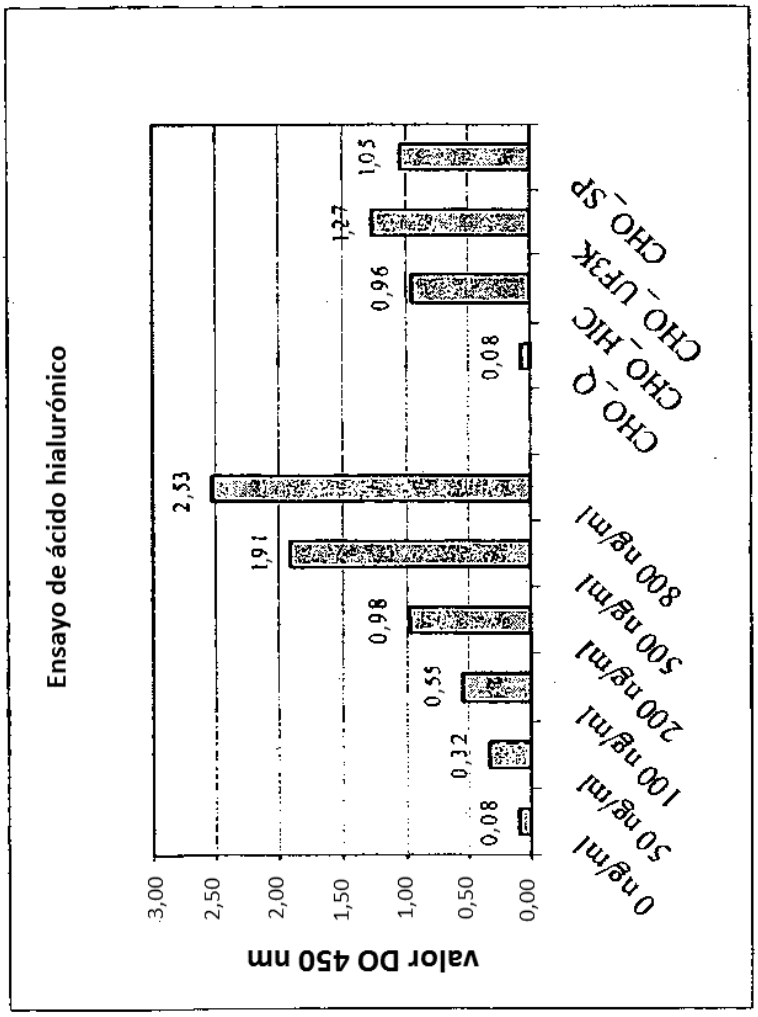


FIGURA 5



Curva de calibración 0-800 ng/ml

FIGURA 6

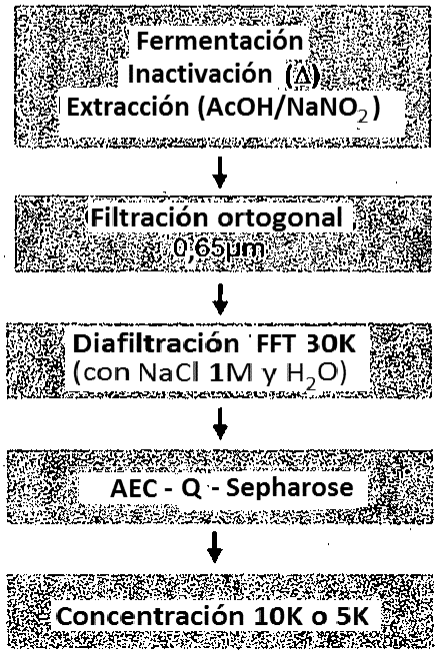

Fermentación
Inactivación (Δ)
Extracción (AcOH/NaNO2)
Filtración ortogonal
0,65µm
Diafiltración FFT 30K
(con NaCl 1M y H2O)
AEC - Q - Sepharose
Concentración 10K o 5K

FIGURA 7

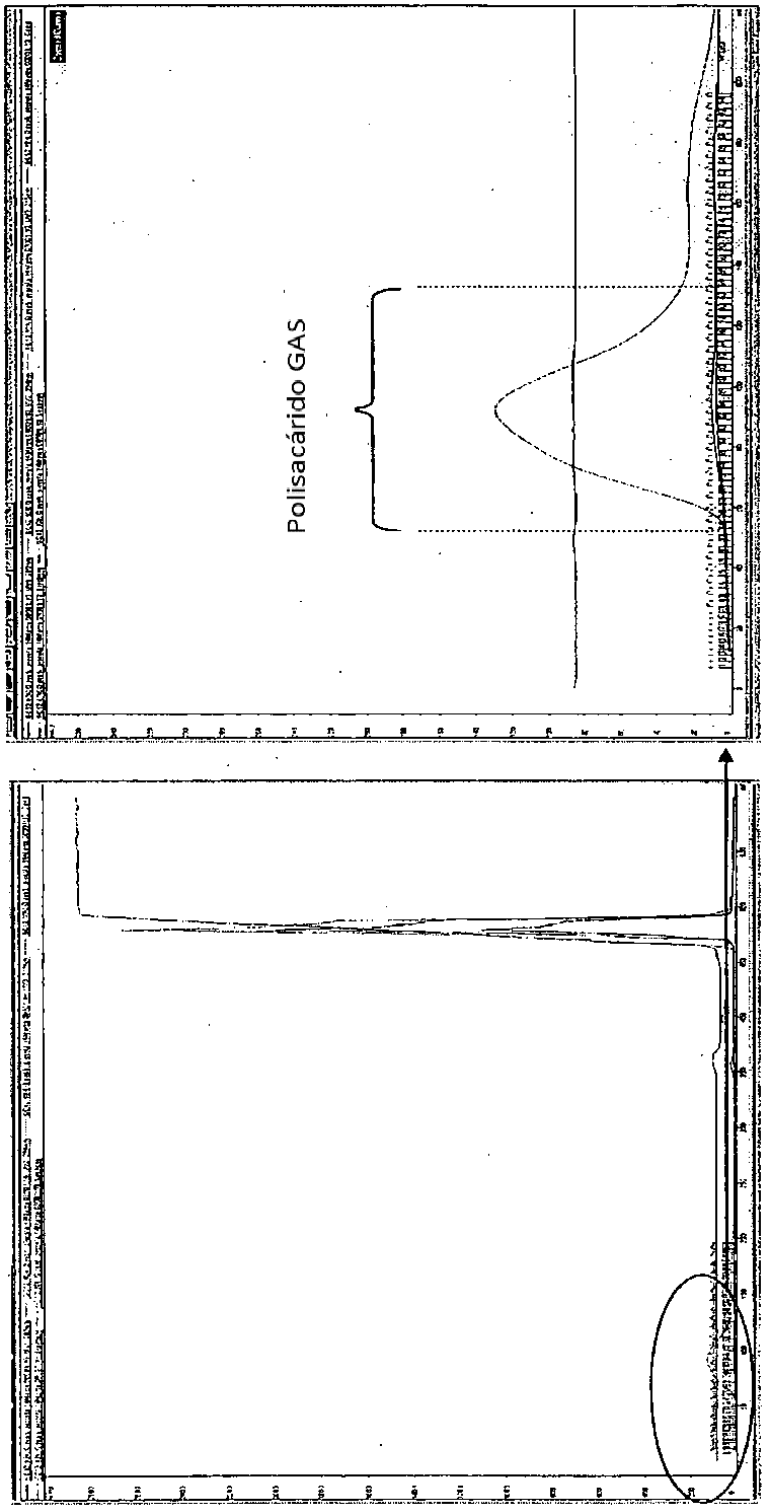


FIGURA 8

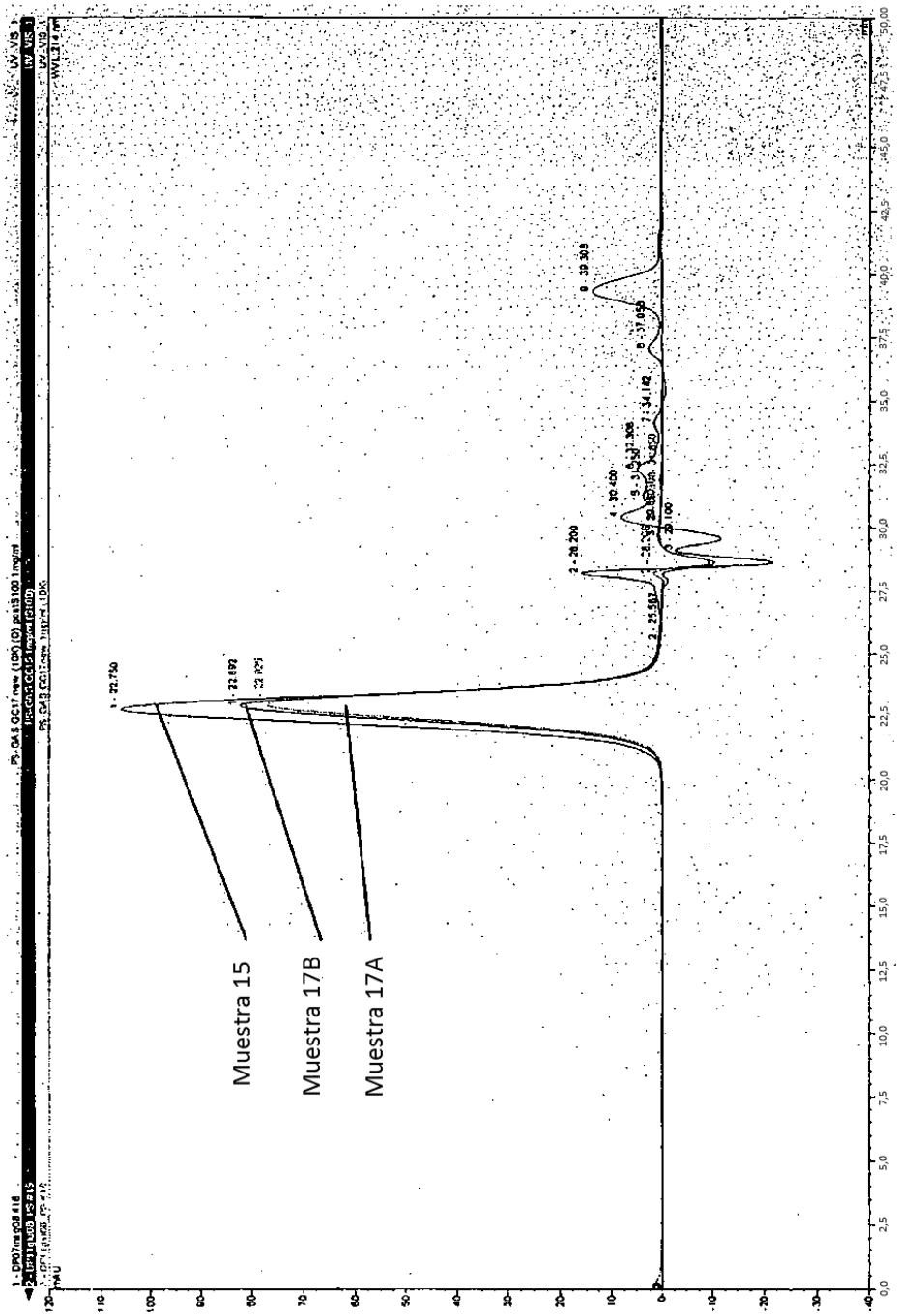
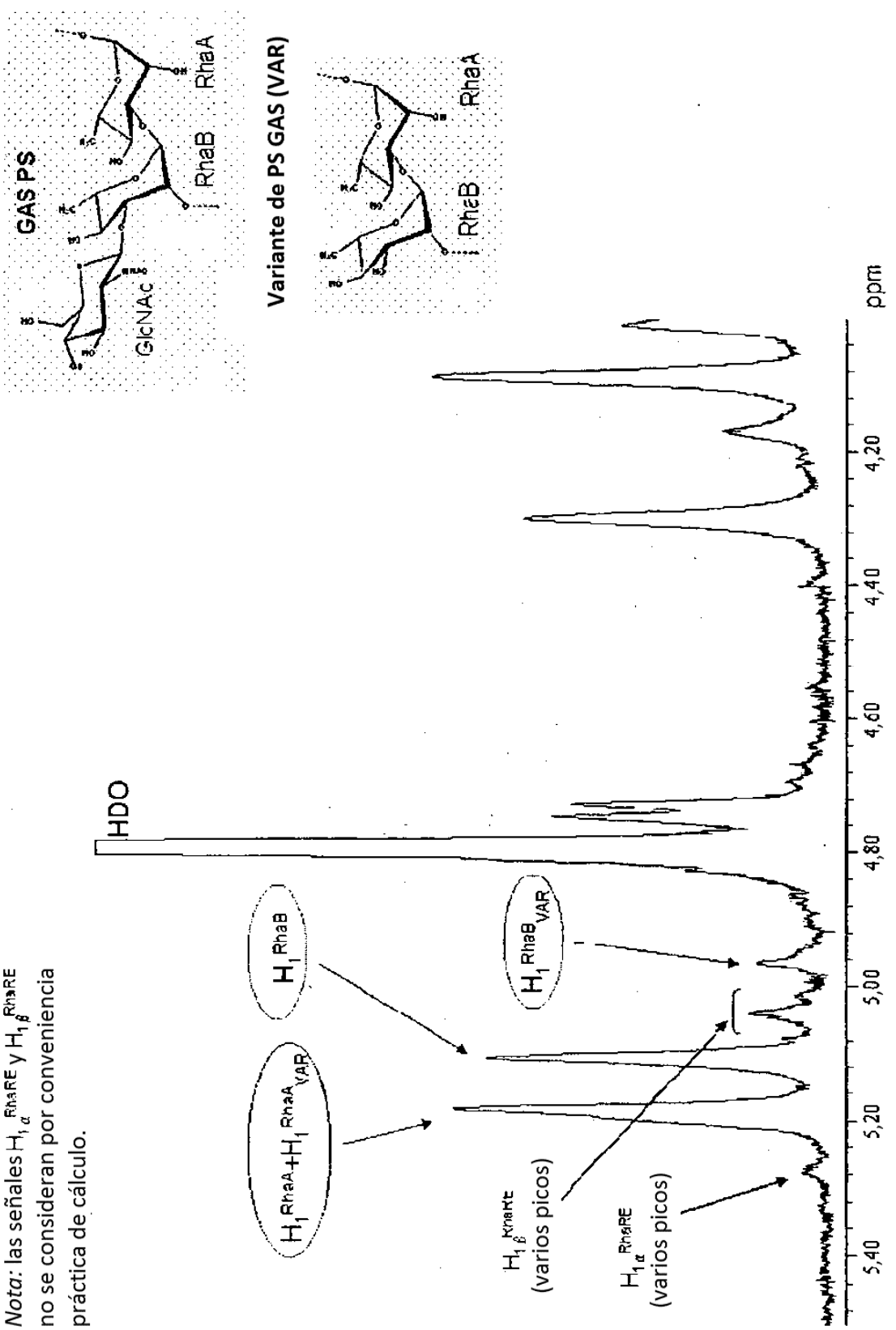


FIGURA 9



Nota: las señales $H_{1\alpha}^{RhaRE}$ y $H_{1\beta}^{RhaRE}$ no se consideran por conveniencia práctica de cálculo.

FIGURA 10

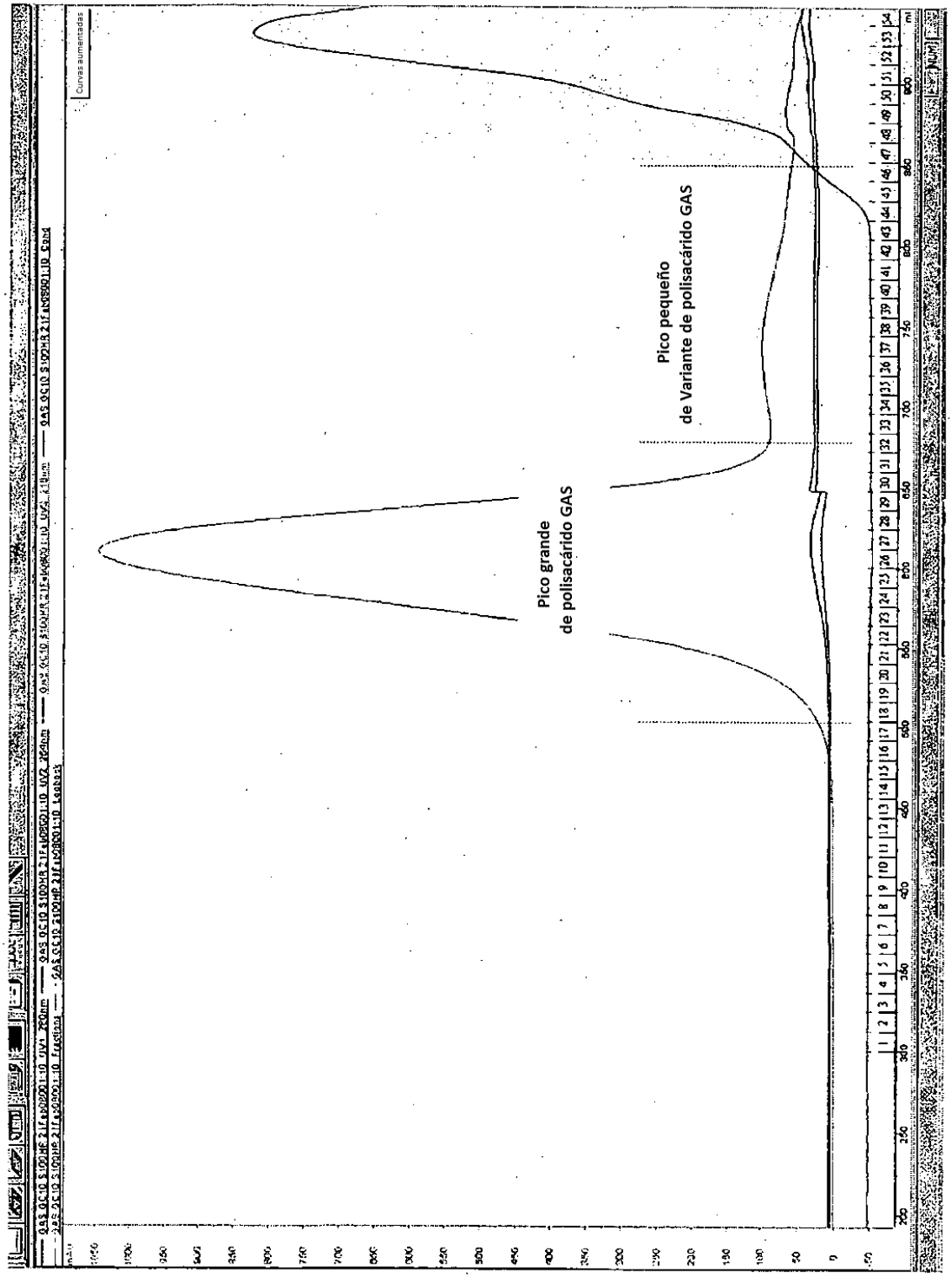
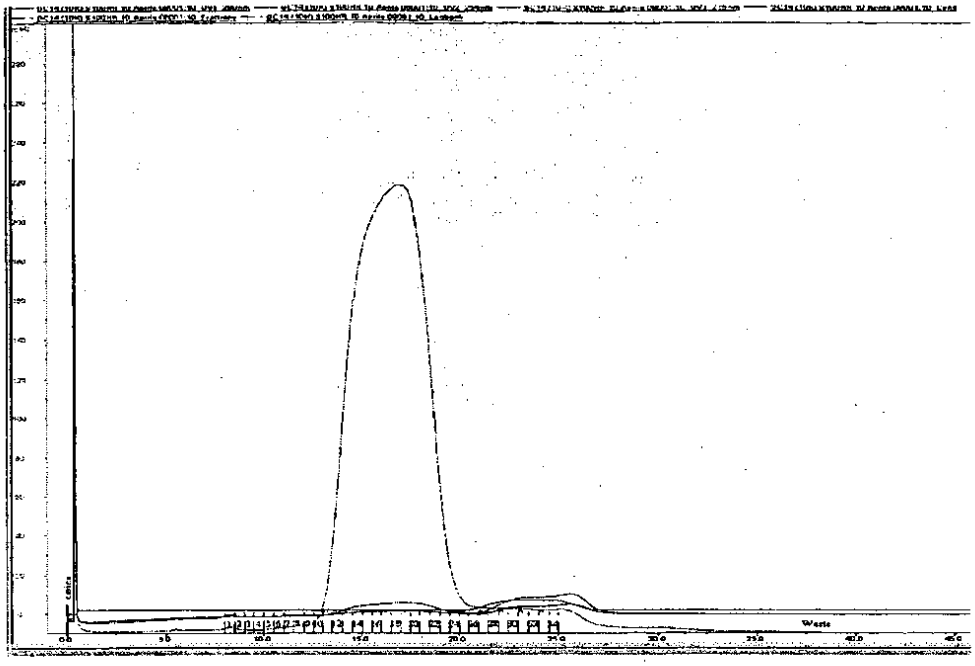

Pico grande
de polisacárido GAS
Pico pequeño
de Variante de polisacárido GAS

FIGURA 11

1)



2)

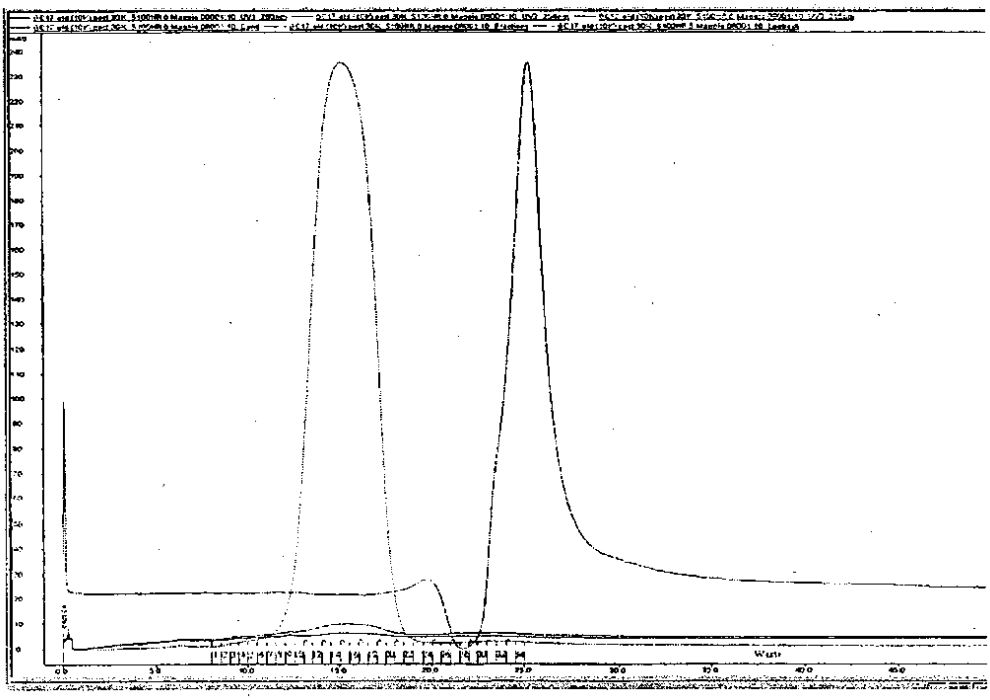


FIGURA 12

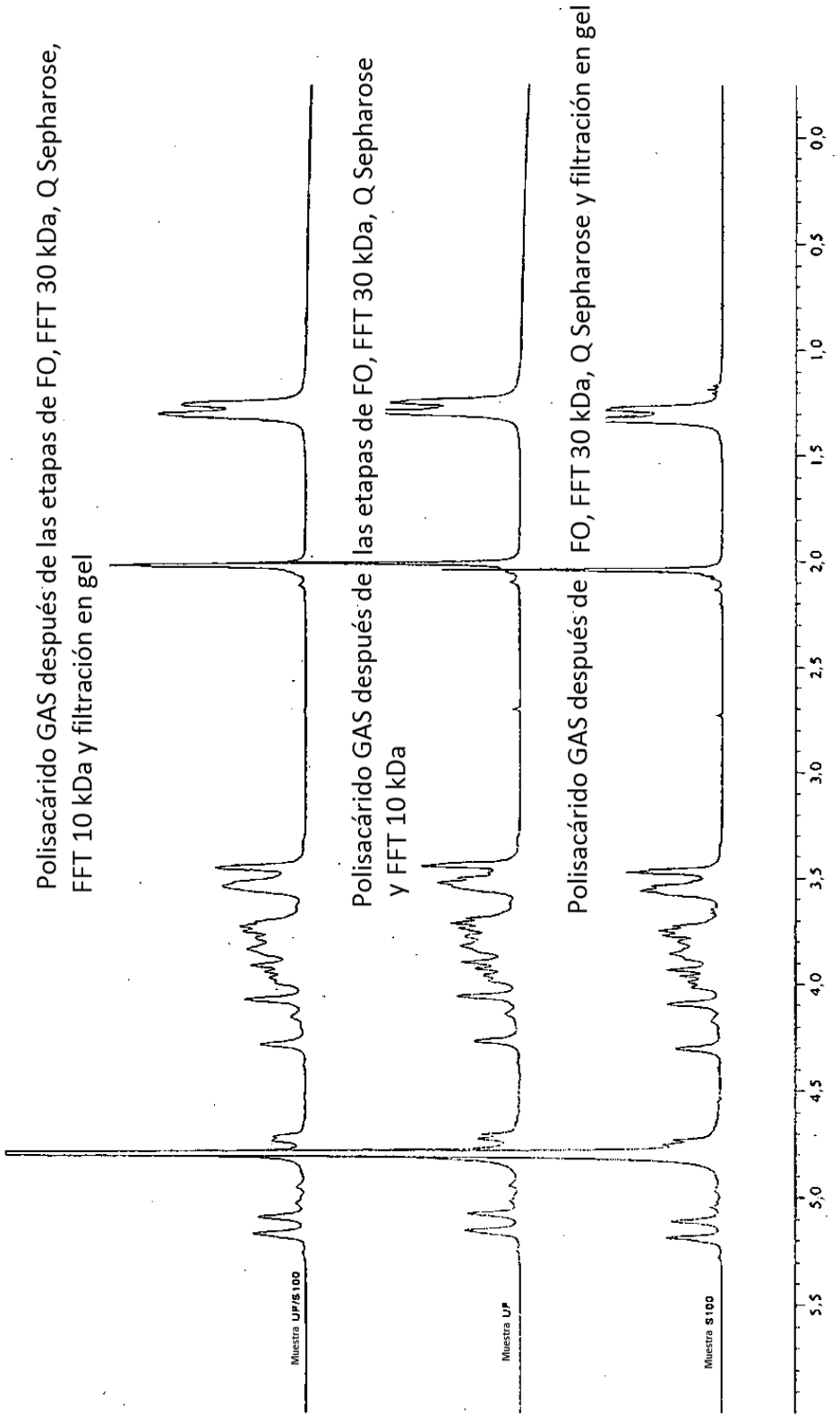

Polisacárido GAS después de las etapas de FO, FFT 30 kDa, Q Sepharose, FFT 10 kDa y filtración en gel
Polisacárido GAS después de las etapas de FO, FFT 30 kDa, Q Sepharose y FFT 10 kDa
Polisacárido GAS después de FO, FFT 30 kDa, Q Sepharose y filtración en gel
Muestra UF/S100
Muestra UF
Muestra S100
5,5
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0

FIGURA 13

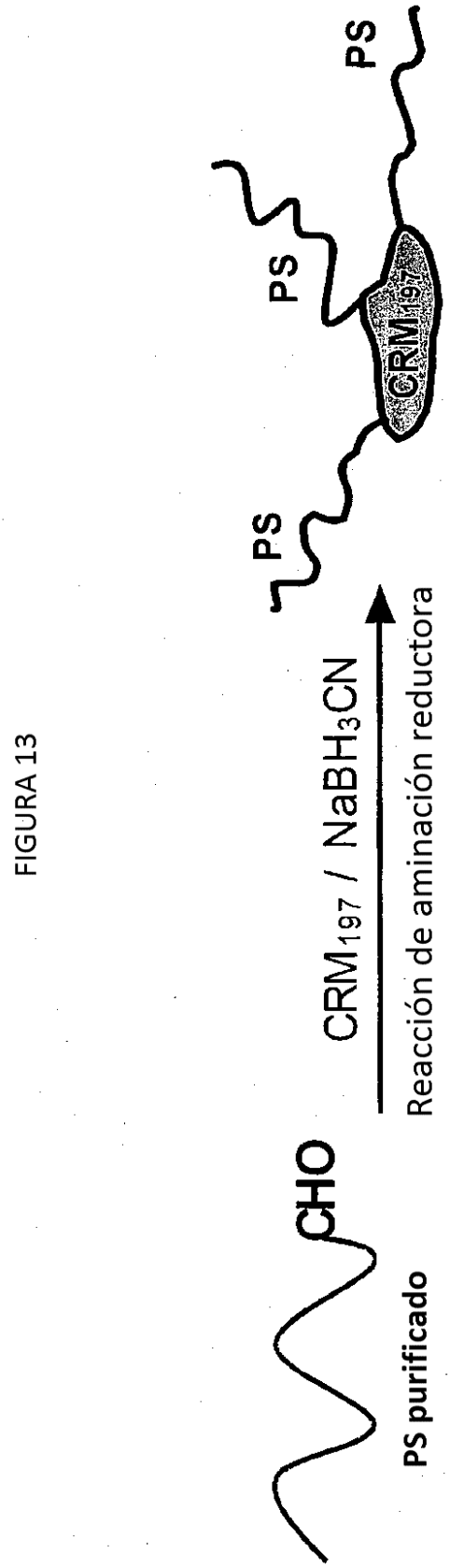

PS purificado
CHO
CRM197 / NaBH3CN
Reacción de aminación reductora
PS
PS
PS
CRM197

FIGURA 14

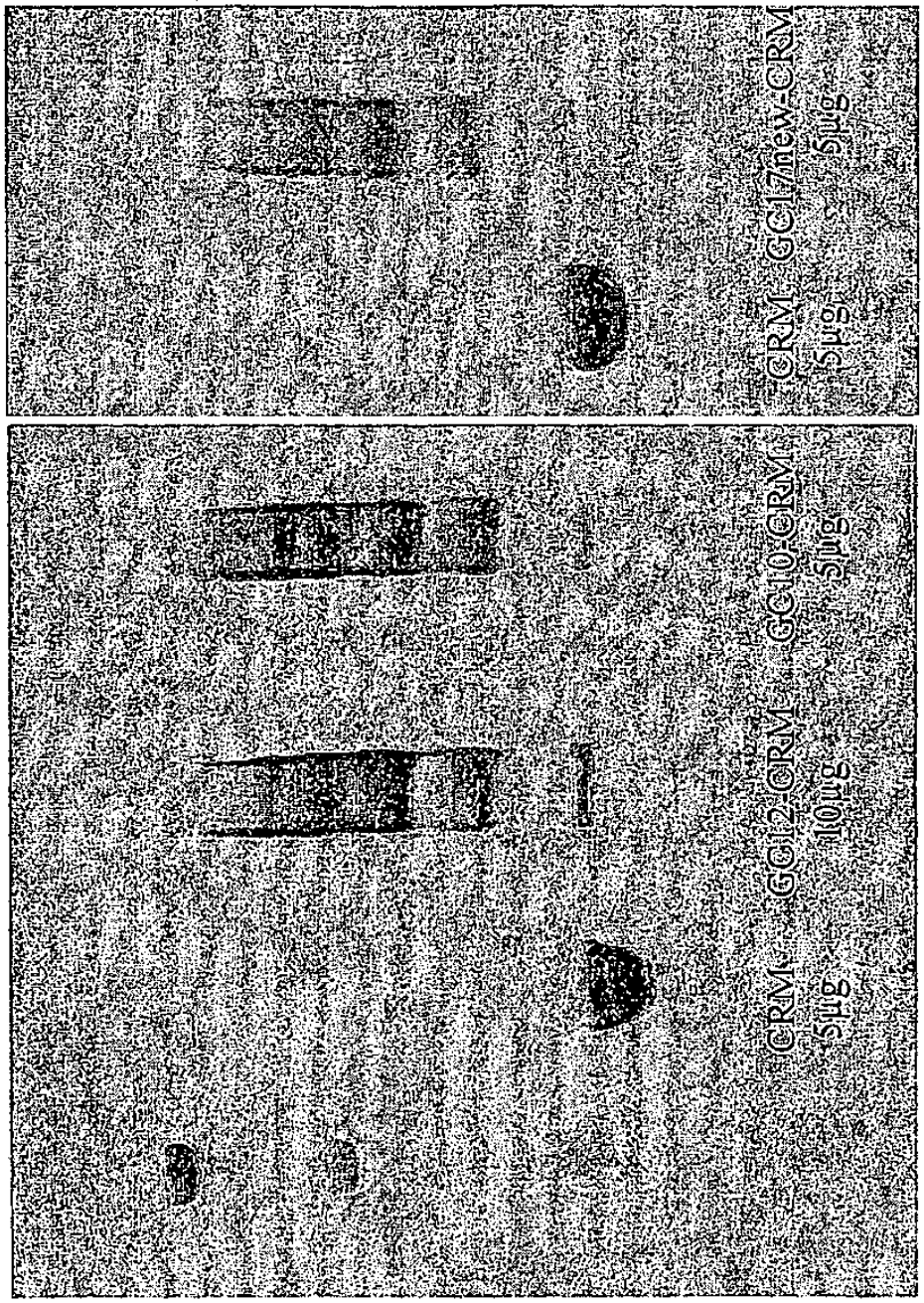
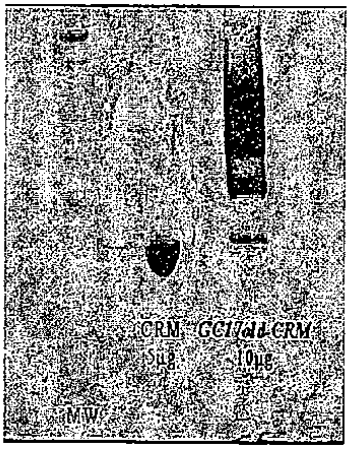
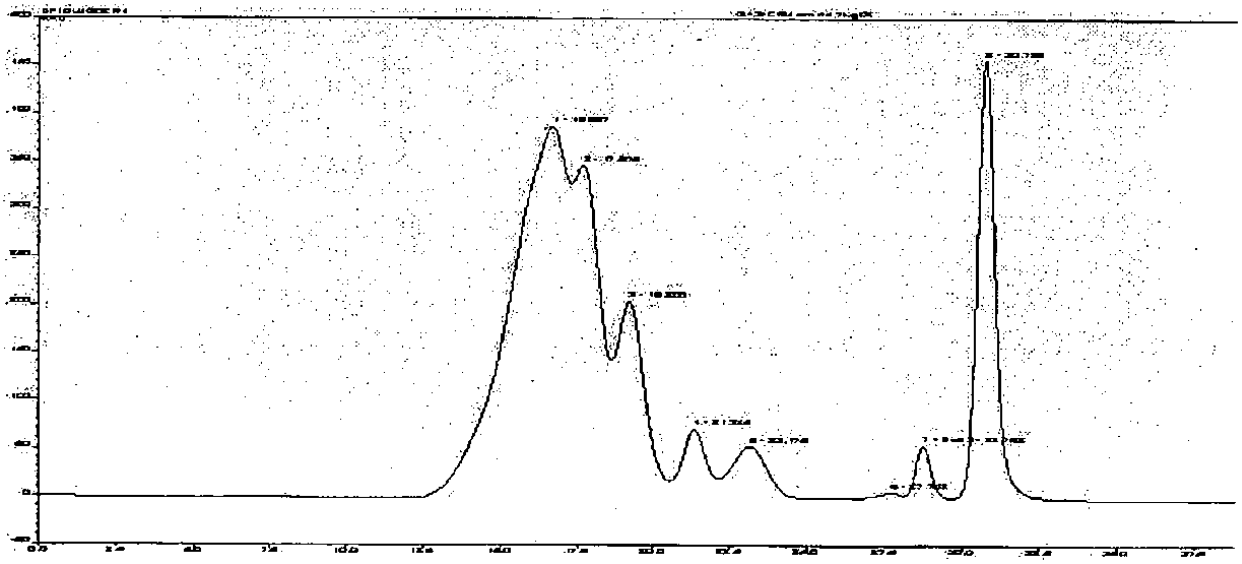


FIGURA 15

1)



2)